

Aus der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin
an der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Leiter: Prof. Dr. med. Michael Hölscher

**Etablierung und Validierung eines RNA basierten Viabilitätstests
zum Nachweis von *Mycobacterium leprae*
aus klinischen Isolaten von Lepra-Patienten aus Togo**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Anna Wöstemeier
aus Lippstadt

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

| | |
|---|--|
| Berichterstatlerin: | Prof. Dr. med. Gisela Bretzel |
| Mitberichterstatterinnen: | Prof. Dr. Barbara Stecher Prof. Dr. Caroline Heer |
| Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: | Dr. med. Marcus Beißner |
| Dekan: | Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 30.04.2020 |

Teile der vorliegenden Dissertation wurden mit Genehmigung des Promotionsausschusses der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München bereits veröffentlicht.

Beissner M., **Woestemeier A.**, Saar M., Badziklou K., Maman I., Amedifou C., Wagner M., Wiedemann F.X., Amekuse K., Kobara B., Herbing K.H., Banla Kere A., Löscher T., Bretzel G. Development of a Combined RLEP/16S rRNA (RT) qPCR Assay for the Detection of Viable *M. leprae* from Nasal Swab Samples. BMC Infect Dis. 19(1):753. 2019.

Kongressbeiträge:

Wöstemeier A., Amekuse K., Bauer M., Maman I., Hegnion K., Wagner M., Helfrich K., Mengele C., Wiedemann F., Badziklou K., Kobara B., Banla Kere A., Löscher T., Bretzel G., Beissner M. Application of Molecular Tools for the Laboratory Confirmation of Leprosy- A Pilot Study from Togo. DTG Jahrestagung. Düsseldorf, Deutschland. 2014.

Bauer M., **Wöstemeier A.**, Amekuse K., Hegnion K., Maman I., Amedifou C., Mengele C., Helfrich K., Wagner M., Kobara B., Wiedemann F., Halatoko W.A., Badziklou K., Banla Kere A., Löscher T., Bretzel G., Beissner M. Application of Molecular Tools for the Laboratory Confirmation of Leprosy Patients and Identification of Silent Transmitters of Leprosy- a Pilot Study from Togo. DTG Jahrestagung. Düsseldorf, Deutschland. 2014.

(Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit)

Bauer M., **Wöstemeier A.**, Amekuse K., Hegnion K., Maman I., Amedifou C., Mengele C., Helfrich K., Wagner M., Kobara B., Wiedemann F., Halatoko W.A., Badziklou K., Banla Kere A., Löscher T., Bretzel G., Beissner M. Application of Molecular Tools for the Identification of Silent Transmitters of Leprosy in Togo. KIT, Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin. Köln, Deutschland. 2014.

(Posterpreis des Kongresses für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin)

Beissner M., Phillips R.O., Badziklou K., Bauer M., **Wöstemeier A.**, Sarfo F.S., Maman I., Symank D., Jansson M., Rhomberg A., Wiedemann F.X., Banla Kere A., Löscher T., Bretzel G. The role of molecular diagnostics in the clinical management and control of Buruli ulcer disease and leprosy - two neglected mycobacterial diseases. European Congress on Tropical Medicine and International Health. Basel, Schweiz. 2015

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Inhaltsverzeichnis..... | 5 |
| Abkürzungsverzeichnis..... | 7 |
| Abbildungsverzeichnis..... | 11 |
| Tabellenverzeichnis..... | 12 |
| 1. Einleitung..... | 14 |
| 1.1. <i>Mycobacterium leprae</i> | 14 |
| 1.2. Geschichtliche Hintergründe..... | 15 |
| 1.3. Epidemiologie..... | 16 |
| 1.4. Globale Lepra-Strategie..... | 17 |
| 1.5. Pathogenese und Klinik | 19 |
| 1.6. Transmission..... | 22 |
| 1.7. Diagnostik..... | 24 |
| 1.8. Therapie und Prophylaxe | 30 |
| 2. Problemstellung und Zielsetzung | 33 |
| 2.1. Problemstellung | 33 |
| 2.2. Zielsetzung..... | 34 |
| 3. Material und Methoden..... | 37 |
| 3.1. Begriffsdefinitionen..... | 37 |
| 3.2. Materialien | 39 |
| 3.2.1. Verbrauchsmaterialien..... | 39 |
| 3.2.2. Enzyme | 40 |
| 3.2.3. Nukleinsäuren und Nukleotide | 41 |
| 3.2.4. Geräte..... | 43 |
| 3.2.5. Materialien zur standardisierten Probenentnahme | 44 |
| 3.2.6. Chemikalien..... | 44 |
| 3.2.7. Diagnostisches Probenmaterial | 46 |
| 3.2.8. Computerprogramme | 48 |
| 3.3 Methoden..... | 49 |
| 3.3.1 Ablauf | 49 |
| 3.3.2. Vorarbeiten | 49 |
| 3.3.3. Entwicklung und Etablierung der konventionellen PCRs..... | 55 |
| 3.3.4. Ergebnisbeurteilung mittels Agarose-Gelelektrophorese | 56 |
| 3.3.5. Weiterentwicklung zur (Reverse-Transkriptase) quantitativen Real-Time PCR (qPCR)..... | 57 |
| 3.3.6. Technische Validierung der qPCR..... | 59 |
| 3.3.7. Validierung anhand klinischer Proben | 61 |

| | |
|--|-----|
| 3.3.8. Qualitätskontrolle | 67 |
| 3.3.9. Statistische Auswertung..... | 69 |
| 4. Ergebnisse | 70 |
| 4.1. Technische Validierung | 70 |
| 4.1.1. Sequenzierungsergebnisse der togoischen Proben..... | 70 |
| 4.1.2. Sensitivität..... | 71 |
| 4.1.3. Spezifität..... | 72 |
| 4.1.4. Intraassay und Interassay Variabilität..... | 72 |
| 4.1.5. Effizienz der qPCR..... | 76 |
| 4.2. Validierung anhand klinischer Proben | 76 |
| 4.2.1. Durchführung der Datenerfassung und standardisierten Probenentnahme | 76 |
| 4.2.2. Datendokumentation..... | 76 |
| 4.2.3. Studienkollektiv..... | 77 |
| 4.2.4. Laborergebnisse der klinischen Validierung | 78 |
| 4.3. Qualitätskontrolle | 88 |
| 4.3.1. Genotypisierung mittels DNA Sequenzierungen | 88 |
| 4.3.2. Interne Positivkontrolle, Positivkontrolle und Negativkontrolle | 89 |
| 5. Diskussion..... | 91 |
| 5.1. Durchführung der Studie „Molecular Diagnosis of Leprosy“ (MDL) | 91 |
| 5.2. Aussagekraft, Zuverlässigkeit und Anwendung der qPCR Diagnostik..... | 93 |
| 5.2.1. Kombinierte RLEP/TTC qPCR..... | 93 |
| 5.2.2. RNA basierter Viabilitätsnachweis | 96 |
| 5.2.3. Transportmedien für optimale Probenqualität | 97 |
| 5.2.4. Negativ getestete Patienten | 98 |
| 5.2.5. Vergleich der RLEP und TTC Kopienzahlen mit anderen Untersuchungen | 99 |
| 5.2.6. Anwendung in der AIM zur Lepradiagnostik in Deutschland..... | 100 |
| 5.3. Zukünftige Anwendung | 101 |
| 6. Zusammenfassung..... | 104 |
| 7. Literaturverzeichnis..... | 105 |
| 8. Anhang | 123 |
| 9. Danksagung | 149 |
| 10. Eidesstattliche Versicherung..... | 150 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|--|
| % (v/v) | Volumenprozent |
| AFB | Säurefeste Stäbchen (engl.: acid-fast bacilli) |
| AITM | Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin. Klinikum der Universität München |
| APP | Proteinausfällungspuffer (engl.: AllPrep protein precipitation buffer) |
| AW1 | Waschpuffer 1 (engl.: wash buffer 1) |
| AW2 | Waschpuffer 2 (engl.: wash buffer 2) |
| BB | Borderline-borderline Lepra |
| BBQ | BlackBerry Fluoreszenz-Löschfarbstoff (engl.: quencher) |
| BCG | Bacillus Calmette-Guérin |
| BL | Borderline-lepromatöse Lepra |
| Bp | Basenpaar(e) |
| BT | Borderline-tuberkuloide Lepra |
| Bzw | Beziehungsweise |
| CBRS | Togoische Ethikkommission (franz.: Comité de Bioéthique pour la Recherche en Santé) |
| CD4 | Unterscheidungsgruppe 4 (engl.: cluster of differentiation) |
| CD8 | Unterscheidungsgruppe 8 (engl.: cluster of differentiation) |
| cDNA | Komplementäre DNA (engl.: complementary DNA) |
| CFP-10 | Kulturfiltrat Protein 10 (engl.: culture filtrate protein 10) |
| CI | Konfidenzintervall (engl.: confidence interval) |
| CLS | Zell-Lysepuffer (engl.: cell lysis solution) |
| CLT | Lepra-, Buruli- und Tuberkulosekontrollleur (franz.: Contrôleurs Lèpre-Buruli-TB) |
| CLT-R | Regionaler Lepra-, Buruli- und Tuberkulosekontrollleur (franz.: Contrôleurs Lèpre-Buruli-TB) |
| CV | Variationskoeffizienz (engl.: coefficient of variation) |
| Ct | Schwellenwert-Zyklus (engl.: cycle threshold) |
| DAHW | Deutsche Lepra- und Tuberkulosehilfe e.V. |
| DAHWT | Deutsche Lepra- und Tuberkulosehilfe e.V., Nationalbüro Togo |
| DEPC | Diethylpyrocarbonate |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid) |
| DNA-Hyd. | DNA Hydratationslösung (engl.: DNA hydration solution) |

| | |
|--------|--|
| EB | Elutionspuffer (engl.: elution buffer) |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ENL | Erythema nodosum leprosum |
| Engl | Englisch |
| Et al. | Und andere (lat.: et alii) |
| 6-FAM | 6-Carboxyfluorescein |
| Franz | Französisch |
| GAPDH | Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase |
| GTQ | Gen-Technologie-Qualität |
| HHC | Häusliche Kontaktperson (engl.: household contact) |
| ICF | Patienteneinverständniserklärung (engl.: „informed consent form |
| ID | Identifikationsnummer (engl.: identification number) |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleukin |
| ILEP | Internationale Vereinigung der Leprahilfswerke (engl.: International Federation of Anti-Leprosy Associations) |
| INH | Institut National d'Hygiène, Ministère de la Santé, Lomé, Togo |
| IPC | Interne Positivkontrolle (engl.: internal positive control) |
| Lat | Lateinisch |
| LL | Lepromatöse Lepra |
| LOD | Nachweisgrenze (engl.: limit of detection) |
| LMU | Ludwig-Maximilians-Universität |
| Max | Maximum |
| MB | Multibazillär |
| MDL | Molecular Diagnosis of Leprosy |
| MDT | Kombinationstherapie (engl.: multidrug therapy) |
| min | Minute |
| MIQE | Minimalanforderungen für die Publikation von quantitativen Real-Time PCR Experimenten (engl.: minimum information for the publication of quantitative real-time PCR experiments) |
| ml | Milliliter |
| M-PCR | Multiplex PCR |
| MVP | Max von Pettenkofer-Institut |
| µl | Mikroliter |

| | |
|----------------------|--|
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| Neg | Negativ |
| NNT | Anzahl der notwendigen Behandlungen (engl.: number needed to treat) |
| NRZ | Nationales Referenzzentrum für Mykobakterien (Borstel) |
| UK | Vereinigtes Königreich (engl.: United Kingdom) |
| PANTA | Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixinsäure, Trimethoprim, Azlocillin |
| PB | Paucilbazillär |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction) |
| PGL | Phenolisches Glykolipid (engl.: phenolic glycolipid) |
| PNLUB-LP | Nationalprogramm zur Bekämpfung des Buruli-Ulkus, der Lepra und der Frambösie (franz.: Programme National de Lutte contre L'Ulcère de Buruli- Lèpre et Pian) |
| Pos | Positiv |
| PPS | Proteinpräzipitationslösung (engl.: protein precipitation solution) |
| qPCR | Quantitative Polymerase-Kettenreaktion |
| RLEP | Repetitives Lepraelement |
| RLEP repeat | RLEP Wiederholung(en) |
| RLT | RNeasy Lysepuffer (engl.: RNeasy lysis buffer) |
| RNA | Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid) |
| RNA _{later} | Ribonukleinsäure Stabilisationspuffer |
| rRNA | Ribosomale RNA |
| RT PCR | Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion |
| RW1 | RNeasy Waschpuffer (engl.: RNeasy washing buffer) |
| SDR | Rifampicin Einmalgabe (engl.: single dose rifampicin) |
| SOP | Standardarbeitsanweisung (engl.: standard operating procedure) |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA-Puffer |
| TLS | Lysepuffer (engl.: tissue lysis solution) |
| TT | Tuberkuloide Lepra |
| TTC | Thymin-Thymin-Cytosin repetitives Lepraelement |
| v. Chr. | Vor Christus |
| WHA | Weltgesundheitsversammlung (engl.: World Health Assembly) |
| WHO | Weltgesundheitsorganisation (engl.: World Health Organization) |
| wD-cont | Kontrolle zum Ausschluss einer Kontamination durch genomische DNA (engl.: genomic DNA wipeout control) |

z.B.

Zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Abbildung 1. Entwicklung der Lepra-Inzidenz und Prävalenz | 16 |
| Abbildung 2. Einteilung des Grades der Behinderung bei Beteiligung der Augen und/oder Extremitäten nach WHO..... | 18 |
| Abbildung 3. Weltweite Entwicklung der Zahl der Grad 2 Behinderungen | 18 |
| Abbildung 4. Weltweite Entwicklung des Anteils der Kinder unter den Neuerkrankungen ... | 19 |
| Abbildung 5. Klinisch-immunologisches Spektrum der Lepra. | 21 |
| Abbildung 6. Geplanter Ablauf..... | 36 |
| Abbildung 7. Weiterverarbeitung der Proben | 66 |
| Abbildung 8. Datenerhebungsformular D1..... | 126 |
| Abbildung 9. Lagerungsprotokoll | 126 |
| Abbildung 10. GenExpress Zertifikat | 127 |
| Abbildung 11. Sequenz RLEP Gen Standard | 128 |
| Abbildung 12. Sequenz TTC Gen Standard | 129 |
| Abbildung 13. Sequenz 16S rRNA Gen Standard | 130 |
| Abbildung 14. Patienteneinverständniserklärung (Seiten 1 und 2)..... | 131 |
| Abbildung 15. Patienteneinverständniserklärung (Seiten 3 und 4)..... | 132 |
| Abbildung 16. Patienteneinverständniserklärung (Seiten 5 und 6)..... | 133 |
| Abbildung 17. Ethikvotum (Seite 1) | 134 |
| Abbildung 18. Ethikvotum (Seite 2) | 135 |
| Abbildung 19. Ethikvotum (Seite 3) | 136 |
| Abbildung 20. SOP.1c: Probenentnahme (Seiten 1 und 2) | 137 |
| Abbildung 21. SOP.1c: Probenentnahme (Seiten 3 und 4) | 138 |
| Abbildung 22. SOP.1c: Probenentnahme (Seiten 5 und 6) | 139 |
| Abbildung 23. SOP.1c: Probenentnahme (Seiten 7 und 8) | 140 |
| Abbildung 24. SOP.1c: Probenentnahme (Seiten 9 und 10)..... | 141 |
| Abbildung 25. SOP2.b: Weiterverarbeitung der RNA/ DNA Proben (Seiten 1 und 2) | 142 |
| Abbildung 26. SOP2.b: Weiterverarbeitung der RNA/ DNA Proben (Seiten 3 und 4) | 143 |
| Abbildung 27. SOP2.b: Weiterverarbeitung der RNA/ DNA Proben (Seiten 5 und 6) | 144 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1. Für (RT) (q) PCR verwendete <i>M. leprae</i> Gene mit entsprechender Publikation | 28 |
| Tabelle 2. Publierte Kopienzahlen von RLEP und TTC mit der entsprechenden Veröffentlichung und Herkunft des Probenmaterials | 29 |
| Tabelle 3. Verbrauchsmaterialien | 39 |
| Tabelle 4. Enzyme..... | 40 |
| Tabelle 5. Nukleinsäuren und Nukleotide | 42 |
| Tabelle 6. Geräte | 43 |
| Tabelle 7. Materialien zur standardisierten Probenabnahme | 44 |
| Tabelle 8. Chemikalien | 46 |
| Tabelle 9. Zur Etablierung verwendete Patientenproben im Transportpuffer CLS | 47 |
| Tabelle 10. Zur Spezifitätsprüfung verwendete Bakterienspezies und deren Herkunft..... | 48 |
| Tabelle 11. Computerprogramme | 48 |
| Tabelle 12. Anzahl der TTC Wiederholungen der in der NCBI GenBank vorhandenen <i>M.</i> <i>leprae</i> Sequenzen | 51 |
| Tabelle 13. RLEP Primer mit zugehöriger Nukleotidposition im <i>M. leprae</i> Genom und entsprechender Amplikon Länge. | 52 |
| Tabelle 14. TTC Primer mit zugehöriger Nukleotidposition im <i>M. leprae</i> Genom und entsprechender Amplikon Länge | 52 |
| Tabelle 15. 16S Primer mit zugehöriger Nukleotidposition im <i>M. leprae</i> Genom und entsprechender Amplikon Länge | 53 |
| Tabelle 16. RLEP Primer und Hybridisierungssonde mit zugehöriger Nukleotidposition im <i>M.</i> <i>leprae</i> Genom und entsprechender Amplikon Länge. | 53 |
| Tabelle 17. TTC Primer und Hybridisierungssonde mit zugehöriger Nukleotidposition im <i>M.</i> <i>leprae</i> Genom und entsprechender Amplikon Länge. | 54 |
| Tabelle 18. 16S Primer und Hybridisierungssonde mit zugehöriger Nukleotidposition im <i>M.</i> <i>leprae</i> Genom und entsprechender Amplikon Länge. | 55 |
| Tabelle 19. Ein- und Ausschlusskriterien für die Studienteilnahme | 63 |
| Tabelle 20. Übersicht über die entnommenen Proben in vier zu evaluierenden Transportpuffern pro Lepra-Patient..... | 64 |
| Tabelle 21. Verwendete Qualitätskontrollen bei der qPCR. | 69 |
| Tabelle 22. Togoische Sequenzen der Abschnitte RLEP, TTC und 16S rRNA mit entsprechender Amplikon Länge | 70 |

| | |
|--|-----|
| Tabelle 23. Bestimmung der RLEP Kopienzahl | 71 |
| Tabelle 24. Bestimmung der TTC Kopienzahl..... | 71 |
| Tabelle 25. Ergebnisse Intraassay Variabilität | 73 |
| Tabelle 26. Ergebnisse der Interassay Variabilität | 75 |
| Tabelle 27. Laborergebnisse der klinischen Validierung..... | 79 |
| Tabelle 28. RLEP qPCR Ergebnisse aus den Transportmedien CLS, TLS, RNAlater und PANTA zum <i>M. leprae</i> DNA Nachweis | 82 |
| Tabelle 29. TTC qPCR Ergebnisse aus den Transportmedien CLS, TLS, RNAlater und PANTA zum <i>M. leprae</i> DNA Nachweis | 85 |
| Tabelle 30. 16S rRNA RT-qPCR Ergebnisse aus den Transportmedien RNAlater und PANTA zum <i>M. leprae</i> RNA Nachweis | 87 |
| Tabelle 31. DNA positive, RNA negative Proben..... | 88 |
| Tabelle 32. Vor- und Nachteile der RLEP qPCR und 16S rRNA RT-qPCR..... | 103 |
| Tabelle 33. Anleitung zur DNA Extraktion aus Transportpuffer CLS | 123 |
| Tabelle 34. Anleitung zur DNA Extraktion aus Transportpuffer TLS | 123 |
| Tabelle 35. Anleitung zur kombinierten RNA/DNA Extraktion aus den Transportpuffern RNAlater und PANTA | 124 |
| Tabelle 36. Ergebnisse der Spezifitätstestung | 125 |
| Tabelle 37. qPCR Ergebnisse der klinischen Validierung | 148 |

1. Einleitung

1.1. *Mycobacterium leprae*

Der Erreger der Lepra, *Mycobacterium leprae*, gehört zur Familie der *Mycobacteriaceae*. Mykobakterien sind aerobe, nicht Sporen bildende Stäbchen, die sich durch einen hohen Mureingehalt in der Zellwand und eine besondere Widerstandsfähigkeit gegenüber Säuren und Basen auszeichnen. Mittels Gram-Färbung sind Mykobakterien nur schwer anzufärben, der Zellwandaufbau entspricht jedoch weitestgehend dem grampositiver Bakterien. Neben einer Schicht von Peptidoglykanen enthält die äußere Zellwand der Bakterien Proteine, Phospholipide, Polysaccharide (Arabinogalactan), Glykolipide, langkettige Mykolsäuren und Wachse, welche bis zu 60% der Bakterientrockensubstanz ausmachen. (1) Dieser hohe Anteil an Wachsen und Lipiden ist verantwortlich für das langsame Wachstum, eine schlechte Anfärbbarkeit, eine geringe Permeabilität für Antibiotika und eine weitgehende Unempfindlichkeit gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen. Aufgrund dessen werden auch im Rahmen einer Desoxyribonukleinsäure (engl.: "deoxyribonucleic acid"; DNA) und Ribonukleinsäure (engl.: "ribonucleic acid"; RNA) Extraktion längere Inkubationszeiten mit entsprechenden Enzymen (z.B. Lysozym, Proteinase K) zur Lyse der Zellwand benötigt. (1) (2) (3)

M. leprae ist ein 1,5µm langes, 0,3µm breites, leicht gebogenes Stäbchenbakterium, welches obligat intrazellulär lebt und einen Tropismus für Schwann-Zellen und Makrophagen aufweist, in denen sich das Bakterium auch vermehrt. Nach Phagozytose durch einen Gewebsmakrophagen verhindert das Bakterium die Verschmelzung von Phagosom und Lysosom. Gegen antimikrobielle Stoffe und damit vor Inaktivierung im Phagosom schützt die Mykolsäureschicht des Mykobakteriums. Hierdurch kann, abhängig von der individuellen Immunlage, durch Vermehrung im Phagosom schließlich der Zelltod des Makrophagen herbeigeführt werden. (1) (2) (3)

Die mikroskopische Darstellung von Mykobakterien ist mit Hilfe von karbolfuchsinhaltigen Spezialfärbungen z.B. nach Ziehl-Neelsen oder Kinyoun möglich. Die Generationszeit von *M. leprae* beträgt 12-14 Tage und eine erfolgreiche Kultivierung in vitro gelang bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht. Eine in vivo Kultur wurde erstmals 1960 an Pfoten thymektomierter Mäuse durchgeführt. Relevanz besitzt das Mausmodell aktuell noch immer zur Therapiekontrolle in der Resistenztestung und dem Viabilitätsnachweis. Seit 1971 dient auch das südamerikanische Gürteltier *Dasypus novemcinctus* als Tiermodell für die Lepraforschung, welches neben dem Eichhörnchen *Sciurus vulgaris* und dem Schimpansen *Pan troglodytes*,

das einzige bekannte immunologisch kompetente Säugetier ist, in dem sich *M. leprae* repliziert. (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11)

Der Zeitraum zwischen stattgehabter Infektion mit den Mykobakterien und klinischer Manifestation ist nicht genau bekannt (2) (8) (12) (13) (14), in der Literatur variieren die Angaben zur Inkubationszeit zwischen 3 Monaten bis zu 30 Jahre. (10) (15)

1.2. Geschichtliche Hintergründe

Die Lepra ist eine der ältesten bekannten Infektionskrankheiten der Menschheit. Erste archäologische Hinweise der Lepra stammen aus dem Jahre 1550 vor Christus (v. Chr.) von einem medizinischen Papyrus aus Ägypten. (16) (17) Es wird angenommen, dass die Erkrankung auch im Neuen und Alten Testament der Bibel Erwähnung findet. Jedoch sind diese Hinweise wissenschaftlich umstritten. Die frühesten allgemein akzeptierten Referenzen stammen aus dem Jahre 600 v. Chr. aus Südasien. (16) (17)

Wissenschaftliche Theorien gehen davon aus, dass sich die Krankheit ursprünglich von Ostafrika nach Vorderasien, Asien und Europa ausbreitete. Durch Migration und wachsende Handelsbeziehungen gelangte *M. leprae* schließlich weiter nach Westafrika und Amerika. (18) Die Lepra war im Mittelalter eine Massenseuche in Europa und erreichte den Höhepunkt ihrer Ausbreitung im 13. Jahrhundert. Zum Ende des 16. Jahrhunderts zeigte sich die Ausbreitung rückläufig, allerdings trat die Lepra noch bis zum Ende des 19. Jahrhunderts in Skandinavien auf. (18) (19) (20) (21)

Im Jahr 1873 entdeckte der Norweger Gerhard Henrik Armauer Hansen *M. leprae* als den kausalen Erreger der Lepra und gilt damit als Begründer der Leprologie. Zu diesem Zeitpunkt existierte allerdings noch keine effektive Therapiemöglichkeit. Der erste Durchbruch in der Behandlung wurde 1947 mit Einführung des Antibiotikums Dapson erzielt. Die lebenslange Behandlungsdauer und eine in den 1960er Jahren primäre und sekundäre Resistenzbildung von bis zu 30% der getesteten Erreger erschwerten jedoch die Therapie. (22) Nach Entwicklung und Einführung weiterer antimykobakterieller Substanzen konnte die Therapie zu Beginn der 1960er Jahre durch Verwendung von Rifampicin und Clofazimin erweitert werden (1), sodass nach ausgedehnten Studien 1981 schließlich von der Weltgesundheitsorganisation (engl.: „World Health Organisation“, WHO) die Anwendung einer Kombinationstherapie (engl.: „multidrug therapy“, MDT), bestehend aus Dapson, Rifampicin - und in Abhängigkeit von der klinischen Einteilung gegebenenfalls Clofazimin - empfohlen wurde. (23) (24)

1.3. Epidemiologie

Die Lepra stellt heute weltweit nach der Tuberkulose die zweithäufigste mykobakterielle Erkrankung bei immunkompetenten Personen dar und tritt in mehr als 90 Ländern auf. Die Inzidenz (Inzidenz = Anzahl der Neuerkrankten) und Prävalenz (Prävalenz = Anzahl der Erkrankten/Anzahl der Einwohner) haben in den vergangenen Jahren und Jahrzehnten abgenommen, wobei ein besonders starker Inzidenzabfall um 60% zwischen den Jahren 2001 und 2005 zu verzeichnen war. (25) (26) (27) Seitdem stagniert der Inzidenzabfall jedoch bei jährlich über 200 000 Neuerkrankungen (Abbildung 1. Entwicklung der Lepra-Inzidenz und Prävalenz während der Jahre 2004-2017), womit von einer anhaltenden Transmission der Erkrankung auszugehen ist. (11) (27) (28) (29) (30) (31) Durch die Ausweitung nationaler Gesundheitsprogramme konnte die Inzidenzrate also vermutlich nur marginal beeinflusst werden. (30) (32) Zudem werden Vollständigkeit und Qualität der an die WHO übermittelten Daten zunehmend kritischer hinterfragt. Für den zeitweilig starken Inzidenzabfall werden verschiedene Erklärungsansätze diskutiert: Zum einen wird eine mögliche Überdiagnose vor dem Jahre 2001 aufgeführt, bedingt durch intensiviertete Kontrollprogramme in den Jahren 1996 bis 2001. Aber auch eine Abnahme der Meldungen neuer Leprafälle infolge einer Verringerung der Abdeckung und Intensität von Lepra-Kontrollprogrammen innerhalb der Folgejahre wird debattiert. (33) (34)

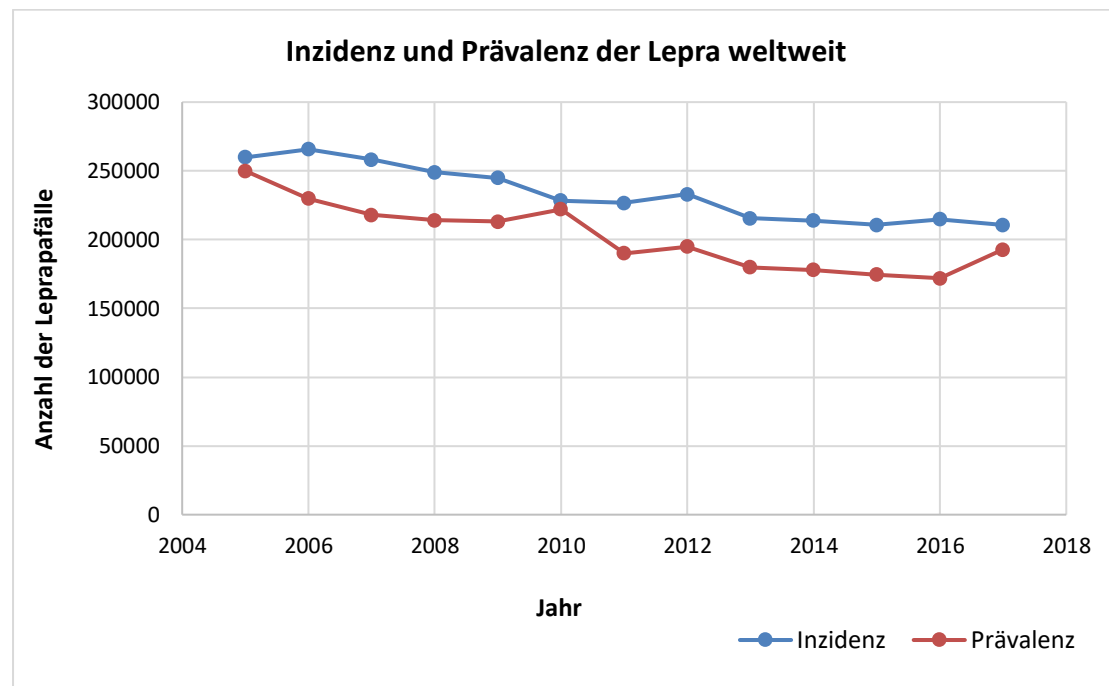


Abbildung 1. Entwicklung der Lepra-Inzidenz und Prävalenz während der Jahre 2004 – 2017 (Quelle der Zahlen: WHO (25) (26) (27) (35))

1.4. Globale Lepra-Strategie

Trotz des in Abschnitt 1.3. beschriebenen Inzidenzabfalls zwischen den Jahren 2001 und 2005, stellen eine verzögerte Diagnosestellung, anhaltende Diskriminierung von Lepra-Patienten und ein geringer Einfluss bisheriger Maßnahmen auf die Lepra-Transmission die größten Herausforderungen im Kampf gegen die Lepra dar. Durch die globale Lepra-Strategie (engl.: „Global Leprosy Strategy 2016-2020“) der WHO (36) soll daher ein Strategiewechsel hin zur Reduktion der Krankheitslast vorangetrieben werden, welcher auf drei Säulen fußt: (i) Stärkung der Verantwortung nationaler Regierungen, sowie der Koordination und Zusammenarbeit, (ii) Unterbrechung der Lepratransmission und der Komplikationen der Krankheit und (iii) die Beendigung der Diskriminierung Betroffener und Förderung von deren Inklusion. Zur Durchsetzung der Ziele der globalen Lepra-Strategie wurden folgende Indikatoren festgelegt (36):

1. Die Reduktion der Grad 2 Behinderungen (Abbildung 2. Einteilung des Grades der Behinderung bei Beteiligung der Augen und/oder Extremitäten nach WHO) unter den Neuerkrankungen auf weniger als eins pro eine Million, soll erreicht werden. Die Anzahl der Grad 2 Behinderungen ist im Vergleich zur Prävalenz weniger störanfällig gegenüber operativen Einflussfaktoren. In den vergangenen Jahren hat sich die Zahl der Grad 2 Behinderungen und irreversibler Körperschäden jedoch kaum verändert, so waren es 13.886 Fälle im Jahr 2005, während 2017 die Zahl der Grad 2 Behinderungen weltweit bei 12.189 Fällen lag (Abbildung 3. Weltweite Entwicklung der Zahl der Grad 2 Behinderungen). (35)
2. Die Anzahl an Kindern unter den Neuinfektionen und die Zahl an Kindern mit Behinderungen soll auf null reduziert werden. Der Anteil an Kindern unter den Neuerkrankungen wird als Indikator einer anhaltenden Transmission verwendet, welcher in Afrika im Jahr 2017 bei 7,9% und weltweit bei 8,1% lag (Abbildung 4. Weltweite Entwicklung des Anteils der Kinder unter den Neuerkrankungen). (27) (31) (35) (37) (38)
3. Die Anzahl der Länder, deren Gesetzgebung eine Diskriminierung aufgrund einer Lepraerkrankung ermöglicht, soll auf null reduziert werden.

Voraussetzung zum Erreichen der Ziele 1. und 2. ist eine frühzeitige Diagnosestellung und Behandlung von Lepra-Patienten, sowie die Verbesserung von Gesundheitsstrukturen. Eine

Möglichkeit stellt hierzu die Implementierung einer aktiven Patientensuche (engl.: „active case finding“) und die Entwicklung neuer, sensitiver diagnostischer Tests dar. (27) (36)

| | |
|---------------------|--|
| Extremitäten | |
| Grad 0 | Keine Sensibilitätsstörung, keine sichtbaren Deformitäten oder Verletzungen |
| Grad 1 | Sensibilitätsstörung, keine sichtbaren Deformitäten oder Verletzungen |
| Grad 2 | Sichtbare Deformitäten oder Verletzungen |
| Augen | |
| Grad 0 | Keine lepraassoziierten Augenbeteiligungen, kein Hinweis auf Verlust des Sehvermögens |
| Grad 1 | Lepraassoziierte Augenbeteiligung, aber Sehvermögen nicht schwer betroffen (Sehkraft 6/60 oder besser, Finger aus 6 Meter Entfernung lesen können) |
| Grad 2 | Schwere Minderung des Sehvermögens (Sehkraft schlechter 6/60; Finger aus 6 Meter Entfernung nicht lesen können); Lagophthalmus, Iridozyklitis, Hornhauttrübung |

Abbildung 2. Einteilung des Grades der Behinderung bei Beteiligung der Augen und/oder Extremitäten nach WHO (39)

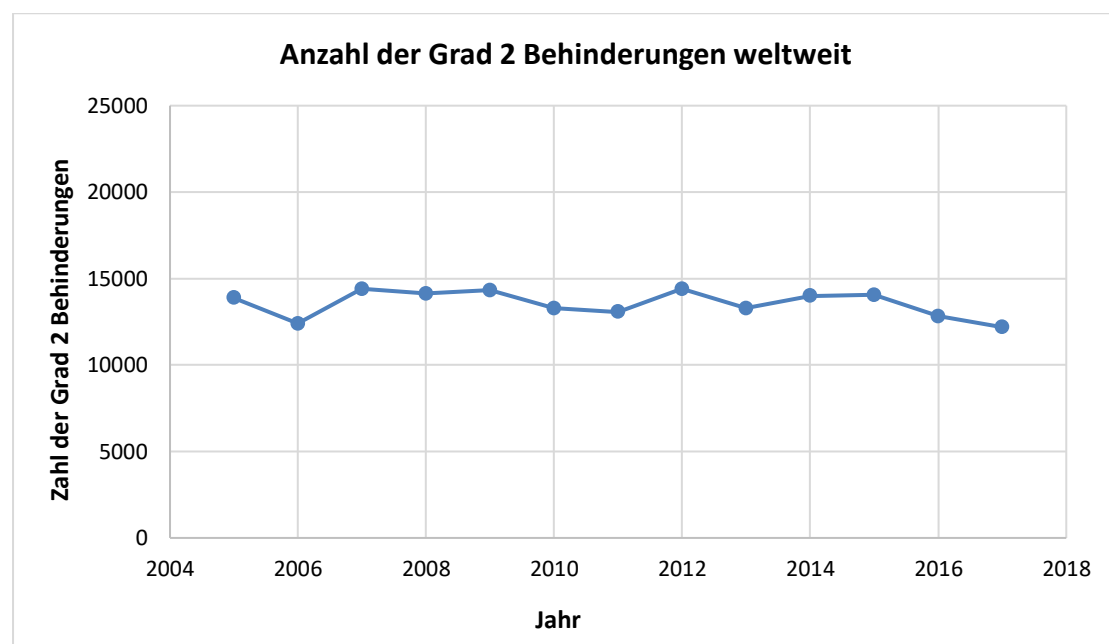


Abbildung 3. Weltweite Entwicklung der Zahl der Grad 2 Behinderungen (Quelle der Zahlen: WHO) (25) (26) (35)

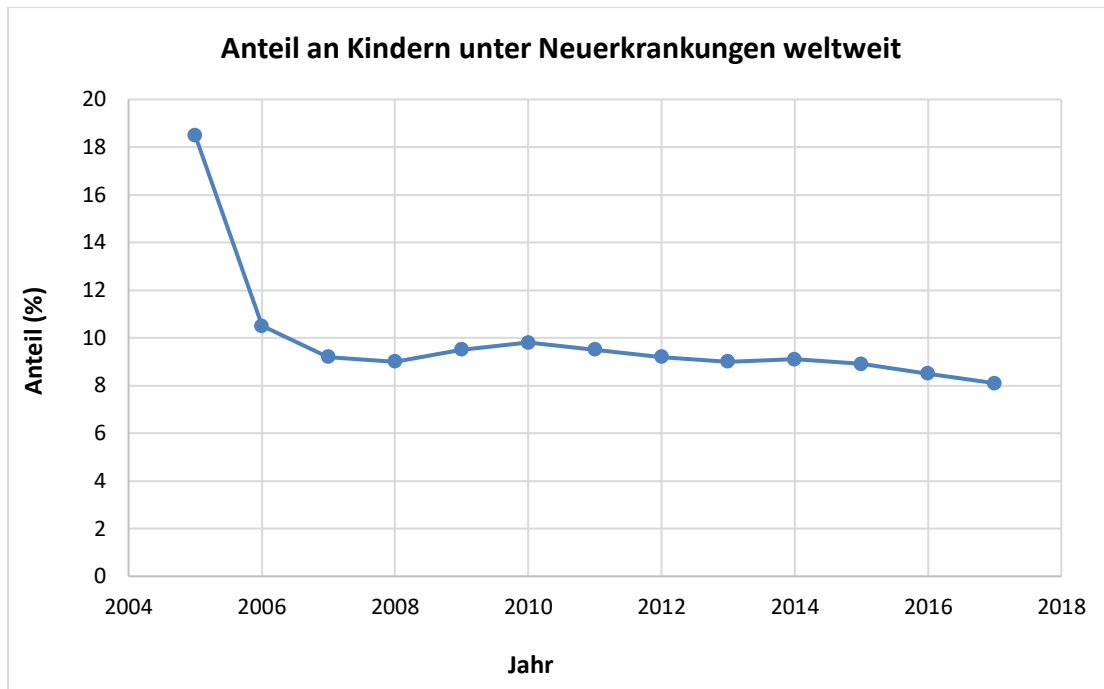


Abbildung 4. Weltweite Entwicklung des Anteils der Kinder unter den Neuerkrankungen (Quelle der Zahlen: WHO) (25) (26) (35)

1.5. Pathogenese und Klinik

Die Lepra manifestiert sich klinisch vorwiegend an der Haut, den peripheren Nerven, sowie der Nasen- und Mundschleimhaut. (11) (40) (41) (42) (43) Es handelt sich um eine chronisch verlaufende Erkrankung, bei der die Pathogenese eng mit der Immunantwort verknüpft ist und somit die verschiedenen klinischen Verlaufsformen bedingt. (40). Auch das Vorhandensein von Mutationen bestimmter humaner Gene, welche immunmodulatorisch wirksam sind, beeinflusst sowohl die Empfänglichkeit als auch den Verlauf der Krankheit. (1) (44) (45)

Das breite Erkrankungsspektrum dieser Infektionskrankheit wurde von Ridley und Jopling nach klinischen, bakteriologischen, immunologischen und histopathologischen Kriterien in fünf verschiedene Lepraformen eingeteilt: Die tuberkuloide Lepra (TT) und lepromatöse Lepra (LL) als polare und stabile Formen und die borderline Lepraformen (borderline-tuberkuloide Lepra [BT], borderline-borderline Lepra [BB], borderline-lepromatöse Lepra [BL]) als instabile Formen. (46) (47) (48)

Die tuberkuloide Form der Lepra ist gekennzeichnet durch eine starke zellulär vermittelte Immunantwort, wobei die Krankheit auf einige gut umschriebene Hautläsionen oder

Nervenstränge begrenzt bleibt. Auf heller Haut erscheinen die Läsionen erythematös. (49) Häufig finden sich bei dieser Form vereinzelte, asymmetrisch angeordnete Läsionen mit verminderter Sensibilität. Betroffene periphere Nerven sind verdickt, druckschmerzhaft und können einhergehen mit sensiblen und motorischen Ausfällen. Sensibilitätsverlust kann wiederum zu Verletzungen und daraus resultierend zu bakteriellen Sekundärinfektionen führen. (11) (40) (50) (51) Eine Schädigung der Augen kann aus der Destruktion des Sehnervs und des direkten bakteriellen Befalls resultieren. (51) Konkret kann die Destruktion des Nervus ophthalmicus zu einer Reduktion des Blinzeln und folgend zu einer trockenen Cornea führen, wodurch das Risiko für kleinere Traumata, Ulzerationen und schließlich Erblindung erhöht wird. (41)

Die Antikörperantwort ist bei der tuberkuloiden Form der Lepra nur sehr schwach vorhanden. Innerhalb der Läsionen wird von CD4 positiven T-Lymphozyten (Unterscheidungsgruppe, engl.: „cluster of differentiation“, CD) vor allem Interferon-Gamma (IFN γ) sezerniert, wodurch entlang von Hautnerven gut abgrenzbare Granulome, bestehend aus Epitheloidzellen und mehrkernigen Riesenzellen, entstehen. Säurefeste Stäbchen sind in den Läsionen nur vereinzelt, teilweise auch gar nicht mikroskopisch zu finden. (1) (2) (52)

Die lepromatöse Lepra, am anderen Pol des Spektrums, ist durch eine sehr starke Antikörperantwort und schwache, zellulär vermittelte Immunantwort gekennzeichnet. Das klinische Bild wird hierbei von zum Teil konfluierenden Läsionen bestimmt, welche nur selten Sensibilitätsstörungen aufweisen. (49) (53) Häufig findet sich eine ausgedehnte bakterielle Infiltration der Haut und peripherer Nerven. In Läsionen der Dermis finden sich mit *M. leprae* gefüllte Makrophagen, jedoch nur sehr wenige CD4 und CD8 positive T-Lymphozyten. Serologisch können hohe Antikörpertiter gegen spezifische *M. leprae* Proteine, wie das phenolische Glykolipid 1 (engl.: „phenolic glycolipid-1“; PGL-1) Antigen, aber auch das kulturelle Filtrat-Protein 10 (engl.: „culture filtrate protein“; CFP-10) und ESTA-6 Protein (engl.: „early secreted antigenic target-6“, ESTA) nachgewiesen werden. (2) (30) (54)

Von der BT über die BB zur BL ist die zellvermittelte Immunantwort abnehmend, die Antikörpertiter, Bakterienlast und die Zahl der Hautläsionen hingegen zunehmend. Im Krankheitsverlauf ist es auch möglich, dass sich die verschiedenen klinischen Verlaufsformen je nach Immunitätslage verändern und in eine andere Form übergehen (Abbildung 5. Klinisch-immunologisches Spektrum der Lepra). (2) (3) (55)

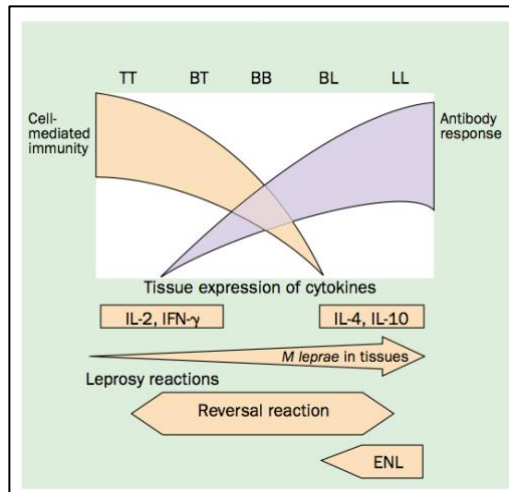


Abbildung 5. Klinisch-immunologisches Spektrum der Lepra. IL = Interleukin; IFN = Interferon; ENL = Erythema nodosum leprosum/ Typ-2-Reaktion; TT = tuberkuloide Lepra; BT = borderline-tuberkuloide Lepra; BB = borderline-borderline Lepra; BL = borderline-lepromatöse Lepra; LL = lepromatöse Lepra; „cell-mediated immunity“= zellvermittelte Immunität; „antibody response“ = Antikörperreaktion; „tissue expression of cytokines“= Zytokine, welche vom Gewebe exprimiert werden; „leprosy reaction“ = Leprareaktion; „reversal reaction“ = Typ-1-Reaktion (Quelle der Abbildung: Britton W.J. 2004 (2))

Während die Klassifikation nach Ridley und Jopling die klinischen und histopathologischen Veränderungen in den Vordergrund stellt, orientiert sich die Einteilung der WHO an den therapeutischen Konsequenzen. Sie teilt die Lepra anhand der klinischen Manifestation in eine multibazilläre (MB) und paucibazilläre (PB) Form ein. Die Klassifikation sollte anhand eines mikroskopischen Nachweises von *M. leprae* und der Klinik erfolgen. Aufgrund begrenzter Ressourcen in vielen endemischen Ländern, orientiert sich die Einteilung in der Praxis jedoch meist nur an den klinischen Manifestationen: Nach WHO Richtlinien wird ein Patient als PB klassifiziert bei bis zu fünf Hautläsionen sowie bei motorischem oder sensiblem Ausfall eines peripheren Nervens. Die Kriterien für die MB Form sind mehr als fünf Hautläsionen oder mehr als ein befallener Nerv. (53) (56) Schätzungsweise 30% der Patienten, einschließlich MB Patienten, erfüllen jedoch nicht eindeutig die oben genannten diagnostischen Kriterien, weshalb zusätzliche labordiagnostische Tests von Bedeutung sind. (57) (58) (59)

Zwecks Therapieentscheidung findet diese Einteilung gegenwärtig in fast allen endemischen Ländern, einschließlich Togo, alleinige Anwendung im klinischen Alltag. Daher wird auch in dieser Arbeit die vereinfachte WHO Einteilung (MB, PB) Verwendung finden. Die vorwiegende Orientierung anhand klinischer Kriterien zur Diagnostik der Lepra führt zu zahlreichen falschen Diagnosen und zeigt gleichzeitig die Relevanz und Notwendigkeit neuer, sensitiver

diagnostischer Methoden, insbesondere molekularer Diagnostika, auf. (11) (53) (57) (60) (61) So wiesen Moorthy et al. im Rahmen einer Studie aus Indien eine Diskrepanz der klinischen und histologischen Diagnose von 62,2% nach. (60) Pardillo et al. konnten auf den Philippinen zeigen, dass 38% der Patienten fälschlicherweise als PB anstatt MB klassifiziert wurden. (61) Dies kann dazu führen, dass Patienten mit einer hohen Bakterienlast über einen zu geringen Zeitraum behandelt werden (Therapie der Lepra im Abschnitt 1.8) und somit auch das Risiko der Wiedererkrankung ansteigt. (53)

1.6. Transmission

Der genaue Übertragungsweg der Lepra ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch scheint die Übertragung der Erreger durch Tröpfcheninfektion von Mensch zu Mensch im Vordergrund zu stehen. So gehen viele Autoren davon aus, dass die oberen Atemwege, insbesondere Nasen-, Rachen- und Kehlkopfschleimhaut, die Haupteintrittspforten für *M. leprae* darstellen. (11) (62) (63) Das Risiko einer Ansteckung korreliert sowohl mit der Bakterienlast des Erkrankten, der individuellen Empfänglichkeit für *M. leprae* als auch der Länge und Intensität der Exposition. (64) Weiter gibt es Hinweise, dass eine erhöhte Luftfeuchtigkeit und geringere Temperaturen mögliche Faktoren darstellen, welche das Risiko einer Leprainfektion erhöhen. (65) (66)

Unbehandelte Lepraerkrankte, insbesondere MB Patienten, stellen aufgrund der hohen Bakterienlast die bedeutendste Infektionsquelle dar. (11) (67) (68) Dennoch legt das Auftreten von Neuerkrankten, ohne vorherigen Kontakt zu Lepra-Patienten, das Vorhandensein weiterer Infektionsquellen nahe. (64) (67) (69) (70) In Endemiegebieten wie Indonesien, Indien und Äthiopien konnte bei bis zu 7,8% der Allgemeinbevölkerung *M. leprae* DNA in Nasenschleimhautabstrichen nachgewiesen werden. (66) (68) (71) In einer hyperendemischen Region im Nordosten Brasiliens konnten Lima et al. bei 28,1% der Bevölkerung *M. leprae* DNA nachweisen. (72)

Im Nordosten von Indien und Brasilien wurden bis zu 49% der Kontaktpersonen von Lepra-Patienten (engl.: „household contacts“; HHCs), welche beispielsweise in einer Wohngemeinschaft mit diesen leben, positiv auf *M. leprae* DNA in der Nasenschleimhaut getestet. (69) (72) (73) Araujo et al. konnten in einer Untersuchung bei 6,7% der HHCs *M. leprae* DNA im Blut und in 18,3% PGL-1 Antikörper nachweisen. Der Nachweis von *M. leprae* DNA im Blut und die PGL-1 Positivität korrelierten zudem mit einem erhöhten Risiko im

weiteren Untersuchungszeitraum von 7 Jahren klinische Manifestationen der Lepra zu entwickeln. (69) HHCs besitzen insgesamt ein höheres Risiko im Vergleich zur Normalbevölkerung, selbst an Lepra zu erkranken. (67) (73) (74) (75) Bei einer Seropositivität für PGL-1 ist das Risiko der Erkrankung für Kontaktpersonen sogar um bis zu 7,5-fach erhöht. (75) (76) Bazan-Furini et al. zeigten in einer prospektiven Studie, dass in einer Kohorte von 58 seropositiven Kontaktpersonen, bereits nach einem Jahr zwei Personen klinische Manifestationen der Lepra entwickelten. (77)

Die Behandlung von Kontaktpersonen im Rahmen einer Chemoprophylaxe zur Unterbrechung der Transmission von *M. leprae* und Reduktion der Lepra-Inzidenz wird momentan in Studien untersucht und im Abschnitt 1.8 genauer erläutert. (78) (79) (80)

Eine transiente *M. leprae* Besiedlung ist wiederum nicht zwingend mit einer klinisch relevanten Infektion gleichzusetzen. (65) (72) (81) Nur bei einem geringen Anteil der exponierten Personen werden klinische Zeichen der Lepra manifest. Der „asymptomatischen Infektion“ (69) kommt somit eine bedeutende Rolle im Übertragungsweg zu. Diese Personen sind nicht erkrankt, werden somit nicht behandelt und stellen ein bedeutendes Reservoir für *M. leprae* dar. (64) (70) Das Vorhandensein von *M. leprae* DNA ohne klinische Manifestation wird von Britton et al. als „subklinische Infektion“ (engl.: „subclinical infection“) bezeichnet. (2) In der Literatur wird dieser Ausdruck jedoch sehr unterschiedlich verwendet und definiert. Einige Autoren benutzen den Ausdruck als Gegenstück zu der aktiven Erkrankung ohne weitere Unterteilung (82) und legen fest, dass die subklinische Infektion mit Hilfe von verschiedenen immunologischen und molekularen Tests festgestellt werden kann. (2) (83) (84) (85) Immunologische Tests für die Identifikation subklinisch Infizierter beruhen auf der spezifischen T-Zell Antikörperantwort (2), Transformation von Lymphozyten (86), IFN γ (83) (85) und PGL-1 (82) (87). Smith et al. konstatiert im Gegensatz hierzu, dass noch kein Test zur sicheren Diagnose einer subklinischen Infektion existiert. (37) (38) Jedoch können Träger von *M. leprae* in der Nasenschleimhaut sicher durch molekulare Diagnostikmethoden nachgewiesen werden, wobei die Nasenschleimhaut nach Araujo et al. die erste Eintrittspforte für *M. leprae* auf dem Infektionsweg darstellt. (69) Die Begriffe „subklinische Infektion“ und „*M. leprae* Träger“ werden in dieser Arbeit synonym verwendet.

1.7. Diagnostik

Laut der internationalen Richtlinie der WHO aus dem Jahre 2018 (engl.: „Guidelines for the Diagnosis, Treatment and Prevention of Leprosy“) (88) und des „International Textbook of Leprosy“ (11), muss zur Diagnose der Lepra mindestens eines der folgenden drei Kriterien vorliegen: (i) Hypopigmentierte oder erythematöse Hautläsion(en) mit Sensibilitätsverlust, (ii) verdickte Hautnerven mit Sensibilitäts- oder Kraftverlust des innervierten Muskels oder (iii) ein mikroskopisch positiver Ausstrich der Lymphflüssigkeit (engl.: „[slit] skin smear“). Aufgrund des eingeschränkten Vorhandenseins an Laborkapazitäten in vielen Endemiegebieten und des Mangels an Standardisierung im Hinblick auf serologische und molekulardiagnostische Tests, beschränken sie die aktuellen Empfehlungen zur Diagnose der Lepra auf die oben genannten Kriterien. (88)

Mikroskopie

Beim „(slit) skin smear“ wird mit einem Skalpell die Haut am Ohrläppchen oder der Rand einer Läsion angeritzt und Lymphflüssigkeit gewonnen, hierbei sollte besonders auf die Vermeidung einer Verunreinigung mit Blut geachtet werden. Die Lymphflüssigkeit kann anschließend auf einem Objektträger nach Spezialfärbung (z.B. nach Kinyoun oder Ziehl-Neelsen) mikroskopiert werden (säurefeste Stäbchen Mikroskopie; engl.: „acid-fast bacilli“ [AFB] microscopy). Die Sensitivität der AFB-Mikroskopie ist jedoch mit $1-3 \times 10^4$ AFB pro Gramm gering. Auch lässt die Mikroskopie eine Unterscheidung zwischen *M. leprae* und anderen Mykobakterien nicht zu. (11) (89)

Histologie

Sensitiver in der Diagnostik der Lepra, im Vergleich zu der AFB-Mikroskopie, ist die histologische Untersuchung von Hautbiopsien oder peripheren Nerven, die als Goldstandard erachtet wird. Besonders in den tuberkuloiden Formen finden sich granulomatöse Infiltrate. Die lepromatöse Form ist eher durch ein gemischtzelliges dermales Infiltrat, bestehend aus Histiozyten mit intrazellulären Aggregaten, Plasmazellen und Lymphozyten bestimmt. (90) (91) Der Nachweis von säurefesten Stäbchenbakterien ist insbesondere in den lepromatösen Formen mit einem hohen Bakterienindex (Bakteriendichte pro Gesichtsfeld) von bis zu 6 (mehr als 1000 Bakterien pro Gesichtsfeld) gegeben. Die tuberkuloiden Formen werden durch Bakterienindizes zwischen 0 und 2 charakterisiert, wobei „Index 0“ keinen Bakterien in 100 Gesichtsfeldern und „Index 2“ zwischen einem und 10 Bakterien pro 10 Gesichtsfeldern entspricht. (46) (11)

Serologie

Der serologische Nachweis von *M. leprae* ist unter anderem mit dem Nachweis spezifischer Antikörper gegen das PGL-1 Antigen möglich, einem Lipid, welches ein Zellwandbestandteil des Mykobakteriums ist. Aufgrund der positiven linearen Korrelation zwischen dem PGL-1 Antikörper Titer und der Bakterienlast kann die Serologie nicht nur zur Diagnostik der Lepra, sondern auch zur Klassifikation und zum Monitoring des Therapieverlaufes angewandt werden. (67) (76) (92) (93)

Unbehandelte MB Patienten weisen in 80%-100% der Fälle spezifische PGL-1 Antikörper auf, bei PB Patienten ist der Nachweis lediglich in 15-60% der Fälle möglich. Aber auch in gesunden Kontrollgruppen aus Endemiegebieten liegt der positive Anteil an PGL-1 Antikörpern bei 1-5%. (13) (54) (94) Ein klarer Grenzwert des PGL-1 Antikörper Titers zur Differenzierung zwischen MB und PB Patienten wurde noch nicht etabliert. (92) (93) Besonders bei Patienten mit einer hohen Bakterienlast kann der Titer zur Therapieüberwachung verwendet werden. Nach Beginn einer antimykobakteriellen Therapie kommt es pro Jahr zu einem Titer-Abfall um 25-50%, so kann ein fehlender Abfall des Titers oder Wiederanstieg nach abgeschlossener Therapie als Hinweis für ein Rezidiv angesehen werden. (54) (57) (95)

Auch zur Einschätzung des Risikos Lepra zu entwickeln wurden serologische Tests bei Kontaktpersonen angewandt. So wurden bei HHCs und anderen Kontaktpersonen höhere Seropositivitätsraten (3%-39%) des PGL-1 Antikörpers, im Vergleich zur Gesamtbevölkerung (1%-27%), festgestellt. (74) Die PGL-1 Seropositivität erhöht das Risiko an Lepra zu erkranken um das ein- bis zu 7,5-fache (76) (75) und wird von einigen Autoren, wie unter 1.6 dargestellt, zur Identifizierung subklinisch Infizierter diskutiert. (82) (87) (92)

Serologische Tests stellen eine sinnvolle Ergänzung für die Diagnose und die Überwachung des Therapieverlaufs der Lepra dar, haben jedoch - besonders beim Nachweis von PB Lepra-Patienten - Limitationen. Oskam et al. postulierten, dass bei alleiniger Anwendung zur Diagnostik 50% der Patienten nicht detektiert würden. (96)

Molekulare Diagnostik

Der definitive Nachweis auch sehr geringer Bakterienlasten wurde in den letzten 20 Jahren durch die Entwicklung von Methoden zur DNA Extraktion, Amplifikation und Detektion *M. leprae* spezifischer DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (engl.: "polymerase chain reaction"; PCR) möglich. (63) Im Vergleich zur Mikroskopie, besitzt diese Methode eine deutlich höhere Sensitivität zur Detektion von *M. leprae*. (63) Sie stellt ein wichtiges

Instrument bei schwer zu diagnostizierenden Fällen, wie beispielsweise bei Patienten mit einem negativen Mikroskopie-Ergebnis, einer rein neuralen Lepraform oder zur Differentialdiagnose von Hautläsionen mit nicht eindeutigem histopathologischem Ergebnis, dar. (63) (97)

Zur molekularen Diagnostik der Lepra mittels PCR sind 12 verschiedene lepraspezifische Gene in der Literatur beschrieben und in der Tabelle 1. (Für [RT] [q] PCR verwendete *M. leprae* Gene mit entsprechender Publikation) aufgeführt. (98) Die am häufigsten verwendeten Gensequenzen waren hierbei RLEP und 16S rRNA, worauf im weiteren Verlauf dieses Abschnitts noch genauer eingegangen werden soll. Unterschiedliche Probenmaterialien wurden mittels PCR untersucht, wobei die Sensitivität (Angabe in Klammern) aufgrund der unterschiedlich hohen Bakterienlast der Materialien jeweils variiert: Biopsien aus Augenläsionen (Iris) und Blut (Santos 2001: 54,5%; Gama 2018: 14%) (99) (100), Hautbiopsien (Kang 2003: 80%; de Witt 1991: 56%; Martinez 2001: 91%; Azevedo 2017: 58%; Chaitanya 2017: 75%; Yoon 1993: 93%; Goulart 2007: 53%) (101) (102) (103) (104) (105) (106), Nasenabstriche (Martinez 2011: 39%; Phetsuksiri 2006: 78%; de Wit 1993: 80%) (62) (102) (107), Nervenbiopsien (Tiwari 2017: 63%) (108), paraffinkonservierte Hautbiopsien (Fiallo 1992: 61%) (109), „skin smears“ (Kang 2003: 73%; Barnerjee 2008: 85%; Rudeeaneksin 2008: 79%; Kampirapap 1998: 71%) (101) (110) (111) (112), Urin (Caleffi 2012: 47%) (113). Die beschriebenen PCRs besitzen eine Spezifität von bis zu 100%.

Auch in Kontaktuntersuchungen wurden verschiedene PCRs bereits erfolgreich zum Nachweis von *M. leprae* DNA angewandt. Wie unter 1.6. beschrieben, ist die Identifikation von *M. leprae* positiven Kontaktpersonen bedeutend für ein besseres Verständnis der Lepra-Transmission. Darüber hinaus kann die PCR Diagnostik einen wichtigen Bestandteil im Rahmen von Kontrollstrategien und zur Identifikation von *M. leprae* positiven Kontaktpersonen zur prophylaktischen Therapie darstellen (siehe 1.8). (66) (67) (68) (69) (71) (72) (74) (73) (75) (79) (81)

Zur Detektion von *M. leprae* DNA wurden in dieser Arbeit die Gensequenzen RLEP und TTC verwendet:

Das lepraspezifische Element (RLEP) ist, als repetitive Nukleotidsequenz, Teil nicht kodierender Abschnitte im *M. leprae* Genom. Pro Genom sind mindestens 19 RLEP Kopien (114) vorhanden (Tabelle 2. Publierte Kopienzahlen von RLEP und TTC mit der entsprechenden Veröffentlichung und Herkunft des Probenmaterials), jedoch mit unbekannter Funktion. Die RLEP-Sequenz besteht aus einem zentralen 545 Basenpaare (bp)

langen Abschnitt, umschlossen von einem variablen und bis zu 100 bp umfassenden Abschnitt. Durch Variation in diesem umfassenden Abschnitt, kommt eine breite Variabilität an RLEP-Aneinanderreihungen zustande. (115) (116) Eine vergleichende Studie mit vier verschiedenen Zielgenen (RLEP, 16S rRNA, sodA, Ag85B) konnte die höchste Sensitivität von 87,1% für die RLEP PCR aus Hautbiopsien nachweisen. (62) In anderen Veröffentlichungen variierte die Sensitivität der RLEP PCR in Abhängigkeit von der Verwendung verschiedener Probenmaterialien zwischen 57% und 81%. (62) (104) (106) (117) Truman et al. entwickelten, zur Amplifikation mittels qPCR, Primer und eine Sonde für die RLEP Konfigurationen 1, 2, 3 und 4 (welche im oben beschriebenen 100 bp Abschnitt variieren), die eine 123 bp umfassende konkordante Nukleotidsequenz aufweisen (siehe 3.3.2.1.). (114)

| Charakterisierung | Amplifizierte Gensequenz (DNA) | Autor/Jahr der Veröffentlichung |
|--|---------------------------------------|--|
| Kodierende Sequenz, 1 Kopie pro Genom | <i>ag36</i> | Hartskeerl 1989 (118) |
| | <i>hsp18</i> | Williams 1990 (119) |
| | <i>groEL1</i> /65-kDa-antigen | Hackel 1990 (120) ; Plikaytis 1990 (121) |
| | 16S rRNA | Pattyn 1992 (122); Richter 1994 (123) |
| | 85B | Martinez 2006 (97); Martinez 2011 (62) |
| | 85A | Martinez 2006 (97) |
| | <i>pra</i> | Wichitwechkarn 1995 (124); Kampirapap 1998 (112); Caleffi 2012 (113) |
| Nicht kodierende, repetitive Sequenz | RLEP | Clark 1989; Yoon 1993 (105); De Wit 1993 (125) Kramme 2004 (126); Goulart 2008 (64); Banerjee 2008 (110); Martinez 2009 (127), Martinez 2011 (62); Yan 2014 (117); Shwakoti 2016 (128); Azevedo 2017 (103); Chaitanya 2017 (104) |
| | TTC repeat | Shin 2000 (129); Banerjee 2008 (110) |
| | 372-Fragment | Yoon 1993 (130); Goulart 2007 (106); Reja 2013 (131); |
| | Amplifizierte Gensequenz (RNA) | |
| Lange Halbwertszeit (Stunden) | 16S rRNA | Kurabachew 1998 (132); Haile 2004 (133); Phetusksiri 2006 (107); Rudeeaneksin 2008 (111); Bang 2009 (134); Martinez 2009 (127), Martinez 2011 (62); Maltempe 2016 (135); Gama 2018 (100); |
| Kurze Halbwertszeit (Sekunden) | <i>sodA</i> mRNA | Martinez 2009 (127), Martinez 2011 (62) |

Tabelle 1. Für (RT) (q) PCR verwendete *M. leprae* Gene mit entsprechender Publikation

Analog zur RLEP Sequenz besteht die Thymin-Thymin-Cytosin (TTC) Sequenz ebenfalls aus repetitiven Abschnitten, gelegen in nicht kodierenden Bereichen innerhalb des *M. leprae* Genoms. Mit mindestens acht bis 37 TTC Kopien pro *M. leprae* Genom variiert diese Anzahl oft in *M. leprae* Stämmen verschiedener Herkunft (Tabelle 2. Publierte Kopienzahlen von RLEP und TTC). (129) (136)

Banerjee et al. etablierten 2008 eine konventionelle, Gel-basierte Multiplex-PCR (M-PCR) basierend auf der Amplifikation der zwei Gentargets (engl.: „target“, Zielsequenz) TTC und RLEP. Die Validierung dieser Methode erfolgte anhand von Stanzbiopsien (Hautläsionen) von Lepra-Patienten aus Indien und erzielte eine Sensitivität von 89,2% bei MB Patienten und 80,3% bei PB Patienten.

| Autor/Jahr der Veröffentlichung | Anzahl der RLEP Kopien | Probenmaterial und Herkunft |
|---------------------------------|------------------------|--|
| Truman, 2008 (114) | 19 | Maus und Gürteltier |
| Cole, 2001 (137) | 37 | Maus und Gürteltier |
| Woods, 1990 (115) | 28 | Gürteltier |
| | Anzahl der TTC Kopien | |
| Shin, 2000 (129) | 10-37 | Humanisolat aus Hautbiopsien und „slit skin smear“ (Philippinen) |
| Srisungngam, 2007 (138) | 15, 16, 17, 19 | Humanisolat aus Hautbiopsien (Thailand) |
| Zhang, 2005 (136) | 8, 13 | Maus und Humanisolat aus „slit skin smear“ (Thailand) |

Tabelle 2. Publierte Kopienzahlen von RLEP und TTC mit der entsprechenden Veröffentlichung und Herkunft des Probenmaterials

Der Nachweis von DNA ist jedoch nicht sinnvoll, um Rückschlüsse auf die Krankheitsaktivität im Rahmen des Therapie-Monitorings zu ziehen, da das Vorhandensein von DNA nicht gleichzusetzen ist mit dem Vorkommen viabler Bakterien. Santos et al. zeigten, in Übereinstimmung mit anderen Studien, dass 54,5% der Patienten auch nach abgeschlossener Behandlung noch ein positives PCR Ergebnis aufwiesen. (99)

Um diesem Problem zu begegnen, besteht die Möglichkeit des RNA Nachweises mittels reverser Transkriptase PCR (RT PCR). (62) (127) (132) (133) Während RNA, im Gegensatz zu

DNA, nur eine Halbwertszeit von wenigen Stunden aufweist, können durch diese Methode auch viable Bakterien nachgewiesen werden. Bei der RT PCR wird zunächst die einsträngige Ribonukleinsäure mittels reverser Transkriptase in komplementäre DNA (engl.: „complementary DNA“, cDNA) umgeschrieben und anschließend durch eine PCR amplifiziert. Eine zusätzliche Quantifizierung der eingesetzten DNA Menge durch Fluoreszenz-Messungen wird durch die quantitative Real-Time PCR (qPCR) möglich. (3) (91) (127) (139) (140) (141) Molekulare Tests, basierend auf dem Nachweis mykobakterieller RNA, wurden bereits zum Nachweis viabler Mykobakterien in klinischen Proben erfolgreich angewandt und stellen bei der Tuberkulose und dem Buruli Ulkus eine Möglichkeit zur Überwachung des Therapieerfolges dar. (142) (143) (144) Auch kann die Identifizierung von Trägern viabler *M. leprae*, ohne klinisches Korrelat, und deren Behandlung einen wichtigen Schritt zur Unterbrechung der fortwährenden Lepra-Transmission darstellen (siehe 1.8).

Zum Nachweis von *M. leprae* RNA wurde in dieser Arbeit die Gensequenz der 16S rRNA verwendet:

Die Gensequenz der 16S rRNA ist Teil eines kodierenden Abschnittes im *M. leprae* Genom und einmalig vorhanden (GenBank Zugangsnummer: NC_002677.1). Die Halbwertszeit der ribosomalen RNA (rRNA) beträgt wenige Stunden und kann somit viable Bakterien nachweisen und zum Therapiemonitoring eingesetzt werden. (141) Martinez et al. entwickelten einen kombinierten 16S rRNA Reverse Transkriptase (RT)/ RLEP Real-Time qPCR Viabilitäts Assay, welcher anhand von archivierten Stanzbiopsien der Haut klinisch und histopathologisch bestätigter MB-Patienten, validiert wurde. Dieser RNA Assay besitzt eine Spezifität von 100% für *M. leprae* bei einer unteren Nachweisgrenze (engl.: „limit of detection“ LOD; geringste Kopienzahl, bei der 95% der Proben positiv getestet werden) von 30-300 Mykobakterien. (62)

1.8. Therapie und Prophylaxe

Von der WHO wird in den Richtlinien aus dem Jahre 2018 eine Therapie bestehend aus täglich 100mg Dapson, 50mg Clofazimin und monatlich 600mg Rifampicin empfohlen. Hierbei sollte die Behandlung paucibazillärer Patienten für sechs Monate und multibazillärer Formen für insgesamt zwölf Monate durchgeführt werden. (88) Zuvor wurden unterschiedliche Kombinationstherapien für die Behandlung der PB und MB Formen empfohlen, die auch heute noch in einigen Ländern Anwendung finden: PB Patienten wurden mittels einer Zweierkombination mit monatlich 600mg Rifampicin und täglich 100mg Dapson für sechs

Monate behandelt, während MB Patienten zusätzlich mit Clofazimin (50mg täglich und zudem 300mg monatlich) für insgesamt zwölf Monate behandelt wurden. (56)

Kontaktpersonen neu diagnostizierter Lepraerkrankter besitzen ein höheres Risiko die Krankheit zu entwickeln. In Studien konnte gezeigt werden, dass eine Einzeldosis Rifampicin (engl.: „single dose rifampicin“; SDR) die Lepra-Inzidenz in der entsprechenden Bevölkerung und auch bei Kontaktpersonen signifikant über einen Zeitraum von zwei Jahren reduzieren kann. (78) (79) Auf Grundlage dessen wird von der WHO die Durchführung einer SDR bei Erwachsenen und Kindern (älter als zwei Jahre) nach vorherigem Kontakt zu Lepra-Patienten ausdrücklich empfohlen. (88)

Der Effekt einer einmaligen Gabe von Rifampicin variiert jedoch stark innerhalb der verschiedenen Gruppen von Kontaktpersonen. (79) (80) Die Antibiotika-Applikation scheint vor allem in Endemiegebieten wie Indien, Brasilien und Nepal effizient zu sein. (37) Jedoch wird auch die SDR Gabe an HHCs in niedrig endemischen Gebieten diskutiert. (37) (145) Smith et al. sowie Lockwood et al. betonen jedoch, dass die Ergebnisse der durchgeführten Pilotstudien nicht vergleichbar mit denen von randomisiert kontrollierten Studien sind: Durch Pilotstudien können sowohl nützliche Daten als auch irreführende Ergebnisse generiert werden. Vor diesem Hintergrund sind weiterführende randomisierte Studien zur Evaluation einer Chemoprophylaxe unabdingbar. (37) (146)

Als Ansatz unserer Arbeitsgruppe bietet die Identifikation von *M. leprae* Trägern ohne klinische Manifestation, die Möglichkeit das individuelle Erkrankungsrisiko durch eine prophylaktisch-therapeutische Intervention zu senken.

Aufgrund der noch immer anhaltenden Stigmatisierung sollte solch ein individueller Therapieansatz für HHCs jedoch mit Bedacht angewandt werden. In den aktuellen Leitlinien der WHO wird die Identifizierung von Kontaktpersonen, insbesondere außerhalb der Familie, nur bei ausdrücklicher Zustimmung des Index-Patienten empfohlen. Sollte die Veröffentlichung der Diagnose durch den Patienten abgelehnt werden, wird in hyperendemischen Gebieten stattdessen die präventive Behandlung beispielsweise einer gesamten Dorfgemeinschaft als Einheitslösung (engl.: „blanket approach“) empfohlen. (88)

Zur Immunprophylaxe wird ein protektiver Effekt der Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Impfung kontrovers diskutiert. (64) (147) Eine Metanalyse aus 29 Studien konnte einen protektiven Effekt von 58% im Mittel nachweisen, wobei in keiner der Studien ein negativer Effekt beobachtet wurde. (148) Der Wirksamkeit ist, wie auch bei der Tuberkulose, mit bis zu 86%

besonders hoch bei jungen Menschen und mit der Zeit abnehmend. (149) (150) (151) Der größte protektive Effekt wird für MB Patienten beschrieben, variiert in unterschiedlichen Studien jedoch erheblich. (152) (153) Der genaue Grund hierfür ist unklar, als beeinflussende Faktoren werden jedoch eine mangelnde Standardisierung der BCG Impfung und Verwendung verschiedener Impfstoffstämme diskutiert. (11) (154)

2. Problemstellung und Zielsetzung

2.1. Problemstellung

Der Rückgang der Lepra-Inzidenz stagniert weltweit trotz einer zeitweisen Reduktion nach Einführung der MDT im Jahr 1981. (42) Lepra stellt daher mit über 200 000 Neuerkrankungen pro Jahr noch immer eine große Herausforderung an die Gesundheitssysteme in mehr als 90 Ländern der Welt dar. (31) (32) Als Parameter für den Erfolg der Lepra-Kontrollmaßnahmen wird die Anzahl der Grad 2 Behinderungen und irreversibler Körperschäden angesehen, welche jedoch mit weltweit 12.189 im Jahr 2017 deutlich oberhalb des von der WHO festgelegten Zielwertes (weniger als eins pro eine Million) lag. Als Indikator einer anhaltenden Transmission wird der Anteil an Kindern unter den Neuerkrankungen verwendet, welcher ebenfalls weltweit noch bei 8,1% im Jahr 2017 lag und somit auch die aktuelle Inzidenzrate erklärt (siehe 1.3 und 1.4). (31) (36) (74) (155) Dies verdeutlicht die Notwendigkeit, der von WHO und ILEP geforderten, neuen innovativen Ansätze zur frühzeitigen Diagnose und Behandlung. (27) (156)

Die bedeutendste Infektionsquelle sind unbehandelte Lepraerkrankte, insbesondere MB Patienten, gefolgt von Trägern des Bakteriums ohne klinische Manifestation – dieser Begriff soll im Folgenden synonym zu dem der „subklinischen Infektion“ verwendet werden. (67) (68) Neue molekulare Tests können sowohl zur Diagnose unbehandelter Patienten, als auch zur Identifikation von *M. leprae* Trägern ohne klinische Manifestation verwendet werden. Das Risiko einer Ansteckung mit *M. leprae* ist bei HHCs in Endemiegebieten um den Faktor 5-31 erhöht. (67) (74) (73) (75) Nur bei einem geringen Teil der *M. leprae* Träger werden tatsächlich klinische Zeichen der Lepra manifest, so variiert die Lepra-Inzidenz unter Kontaktpersonen in Studien zwischen 1% und 8%, über einen Beobachtungszeitraum von bis zu 25 Jahren. (72) (81) In niedrig endemischen Gebieten - wie beispielsweise in Togo – treten Neuerkrankungen vornehmlich unter HCCs auf, da das Risiko einer *M. leprae* Infektion außerhalb des gemeinsamen Lebensraumes deutlich geringer ist. (37) Neue molekulare diagnostische Tests zur Identifizierung von *M. leprae* Trägern bieten die Möglichkeit, im Rahmen des Ansatzes unserer Arbeitsgruppe, durch eine Behandlung das individuelle Erkrankungsrisiko zu senken. Als Voraussetzung zur Reduktion der anhaltenden Transmission durch therapeutische Intervention bei Patienten sowie prophylaktisch-therapeutische Intervention bei Trägern, wird die gezielte Untersuchung und Identifizierung von Trägern viabler *M. leprae* sowohl unter unbehandelten Patienten als auch unter Bakterienträgern ohne klinische Symptomatik

erachtet. (2) (37) (38) (64) (69) (70) (157) (158) (159) Es besteht zudem die Möglichkeit der Quantifizierung der individuellen Bakterienlast, wodurch Rückschlüsse sowohl auf das Übertragungsrisiko von Patienten und *M. leprae* Trägern als auch auf das Erkrankungsrisiko von *M. leprae* Trägern gezogen werden können. (127) (140) Je höher die Bakterienlast viabler Bakterien, desto größer ist das Risiko eines Patienten oder *M. leprae* Trägers ohne klinische Manifestation ein effizienter Überträger zu sein, bzw. das Risiko eines *M. leprae* Trägers ohne klinische Manifestation selbst zu erkranken. Informationen über bakterielle Viabilität und Bakterienlast ermöglichen so auch gezielte, intensiverte Umfelduntersuchungen bei potentiellen Hochrisikotransmittern. (75) (76)

Von der WHO wird in den internationalen Richtlinien aus dem Jahre 2018 die Durchführung einer SDR bei Erwachsenen und Kindern nach vorherigem Kontakt zu Lepra-Patienten ausdrücklich empfohlen. (88) Als alternativen Ansatz verfolgt unsere Arbeitsgruppe das Ziel, *M. leprae* Träger ohne klinische Manifestation zu identifizieren und diese zur Senkung des Transmissionsrisikos gezielt zu behandeln.

Bisher wurde die Leprakontrolle im Rahmen der Nationalprogramme durch passive Patientensuche (engl.: „passive case finding“) durchgeführt, wodurch sich Diagnose und Behandlung häufig verzögern. Daher wird nun auch vermehrt die Möglichkeit einer aktiven Patientensuche (engl.: „active case finding“), zur frühzeitigen Diagnose und Behandlung, Reduktion von Behinderungen und Unterbrechung der Transmission, diskutiert. (36) (79) (81) (82) (88) (156) (157)

2.2. Zielsetzung

Das primäre Ziel dieser Arbeit, welche im Rahmen des Forschungsprojektes „Molecular Diagnosis of Leprosy“ (MDL), finanziert durch die „Deutsche Lepra- und Tuberkulosehilfe“ (DAHW), realisiert werden konnte, war die Etablierung sensitiver molekularer Tests zur Diagnostik von Lepra-Patienten, Detektion von *M. leprae* Trägern ohne klinische Symptome und Identifikation von Trägern viabler *M. leprae* als potentielle Überträger in beiden Gruppen. Zur Identifikation von Lepra-Patienten sollte der Nachweis von *M. leprae* DNA dienen. Zudem können durch diesen Test Kontaktpersonen untersucht und durch Identifizierung und Behandlung von *M. leprae* Trägern ohne klinische Manifestation, deren individuelles Erkrankungsrisiko gesenkt werden.

Durch den RNA Nachweis sollten viable Bakterien detektiert und in Kombination mit der RLEP qPCR die Bakterienlast quantifiziert werden. Hierdurch ist die Überwachung des individuellen Therapieverlaufs sowie die Identifizierung von Personen mit hohem Potential zur Übertragung der Erkrankung möglich, bei denen therapeutische bzw. prophylaktisch-therapeutische Interventionen einen wichtigen Beitrag zur Unterbrechung der Transmission von *M. leprae* und somit zur Reduktion der Lepra-Inzidenz darstellen. (142) (143)

In zuvor durchgeführten, retrospektiv angelegten Studien wurden für molekulare Tests vornehmlich Stanzbiopsien als Probenmaterial verwendet. (63) Im Gegensatz dazu sollten in dieser Arbeit für Endemiegebiete geeignete, nicht invasive und einfach zu entnehmende Nasenschleimhautabstriche zur Diagnostik verwendet und verschiedene Transportmedien evaluiert werden. Zur Patientenrekrutierung und Gewinnung des Probenmaterials sollte eine aktive Fallfindung in Togo implementiert werden (siehe 3.3.7.2.).

Stufenweise sollte hierzu zunächst eine konventionelle PCR und darauf aufbauend eine qPCR zum *M. leprae* DNA und RNA Nachweis entwickelt werden. Für den DNA Nachweis aus Nasenschleimhautabstrichen sollte eine kombinierte qPCR zur simultanen Detektion zweier repetitiver Genabschnitte (RLEP und TTC) verwendet werden. Ein Nachweis von DNA gelingt häufig auch noch nach erfolgreicher Therapie und eignet sich somit nicht zur molekularbiologischen Viabilitätstestung. Daher sollte zum Nachweis von RNA, die nur eine Halbwertszeit von wenigen Stunden besitzt, eine bereits beschriebene Reverse-Transkriptase quantitative Real-Time PCR zur Detektion einer kodierenden RNA Sequenz (16S rRNA) optimiert und modifiziert werden. *M. leprae* RNA wurde zuvor in Hautbiopsien nachgewiesen, jedoch noch nie in Nasenschleimhautabstrichen detektiert.

Für die Entwicklung einer qPCR und eines RNA basierten Viabilitätsnachweises wurden zunächst Sequenzdaten der zu detektierenden Genabschnitte RLEP, TTC und 16S rRNA benötigt. Da diese von *M. leprae* Isolaten aus Togo nicht vorlagen, sollte eine Gensequenzierung der jeweiligen Abschnitte aus Nasenschleimhautabstrichen durchgeführt werden (siehe 3.3.2.1. und 3.3.2.2.). Hierzu sollten konventionelle PCRs für die entsprechenden Zielnukleotidsequenzen entwickelt und durch Sequenzierung der amplifizierten PCR Produkte erste *M. leprae* Sequenzdaten aus Togo generiert werden (siehe 4.1.1.). Auf Grundlage dessen sollten die Zielsequenzen der zu entwickelnden qPCRs bestätigt werden.

Die anschließende technische Validierung dieser Tests besteht aus der Bestimmung der Sensitivität, Spezifität und der Inter-/Intraassay Variabilität (siehe 3.1.).

Anhand von 160 Nasenabstrichen klinisch diagnostizierter MB Lepra-Patienten sollten die Nachweisverfahren klinisch validiert und eine Evaluation der Extraktionsmethoden und verschiedener Transportmedien durchgeführt werden. Auf Grundlage dessen sollten wiederum die molekularen Testverfahren in Togo am „Institut National d’Hygiène“ (INH) implementiert werden (Abbildung 6. Geplanter Ablauf).

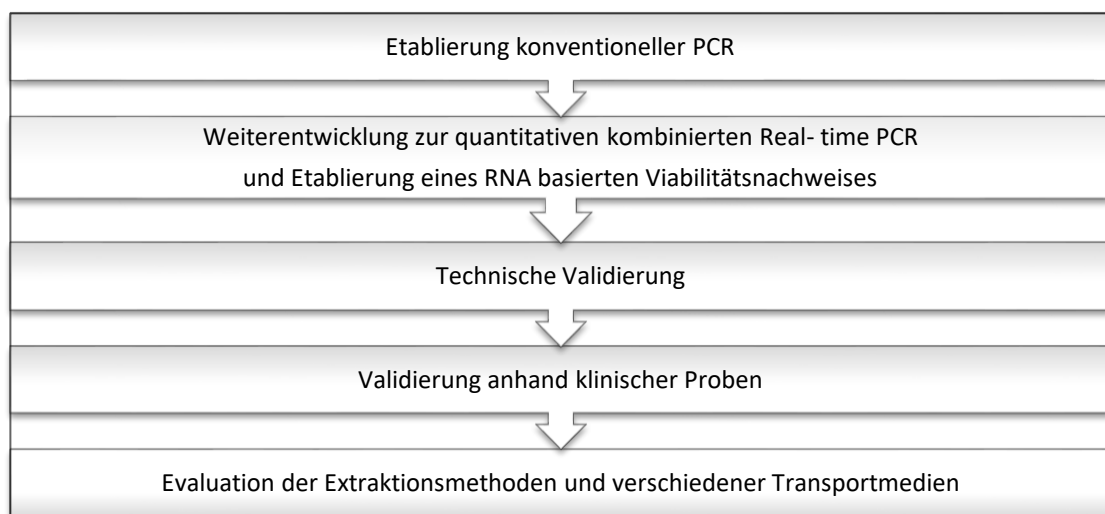


Abbildung 6. Geplanter Ablauf

3. Material und Methoden

3.1. Begriffsdefinitionen

Sensitivität

Die Sensitivität eines diagnostischen Tests gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein an einer spezifischen Erkrankung leidender Patient korrekt als solcher („richtig positiv“) diagnostiziert wird. (91)

Spezifität

Die Spezifität eines diagnostischen Tests gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein gesunder Patient als nicht erkrankt („richtig negativ“) diagnostiziert wird. (91)

Intraassay Variabilität

Die Intraassay Variabilität gibt die Messgenauigkeit eines Tests bezogen auf mehrfache Messungen derselben Patientenprobe innerhalb eines Versuchsansatzes an. (139) (160)

Interassay Variabilität

Die Interassay Variabilität gibt die Messgenauigkeit eines Tests bezogen auf mehrfache Messungen derselben Patientenprobe in verschiedenen Versuchsansätzen an. (139) (160)

Variationskoeffizient

Die Intra- und Interassay Variabilität (statistische Kennwerte) werden durch den Variationskoeffizienten (engl.: „coefficient of variation“; CV) beschrieben, welcher der relativen Standardabweichung entspricht. (160)

Schwellenwert-Zyklus (engl.: cycle threshold; Ct)

Zyklus während der qPCR, in dem das Fluoreszenzsignal einen festgelegten Schwellenwert überschreitet und als positiv zu interpretieren ist. (161)

qPCR Standardkurve

Es besteht eine linear, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Ct-Wert und der eingesetzten DNA Menge. Durch Auftragen des Logarithmus der Ausgangsmenge mit entsprechendem Ct-Wert wird so eine Standardkurve konstruiert, welche der Bestimmung der Effizienz dient. (3)

Anforderungen an die Effizienz

Die theoretische Verdopplung der DNA Menge pro Zyklus entspricht einer Effizienz von 1 (100%) und Steigung der Regressionsgeraden von -3,32. Laut den MIQE Richtlinien (engl.: „minimum information for the publication of quantitative real-time PCR experiments“) sollte diese Steigung zwischen -3,2 und -3,4 betragen. (161)

Anforderungen an die qPCR

Für eine effiziente qPCR und die Veröffentlichung jeweiliger Daten müssen minimale Anforderungen erfüllt werden, welche in den MIQE Richtlinien wie folgt definiert werden: In der Intraassay Variabilität muss der Variationskoeffizient weniger als 0,65 betragen und die maximale Variation aller getesteten Proben innerhalb einer Testung kleiner als 0,35 sein. Für die Interassay Variation muss der Variationskoeffizient kleiner als 2,7 sein und die maximale Variation unter 0,8 liegen. (162)

3.2. Materialien

3.2.1. Verbrauchsmaterialien

| Bezeichnung | Lieferant | Verwendung |
|--|--------------------------------------|----------------------------|
| Sterile Einmal-Pinzetten | Braun, Melsungen, Deutschland | DNA/RNA Extraktion |
| Gel cutter | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland | Sequenzierung |
| Ultrafree DA, Centrifugal filter units | Carl Roth | |
| Untersuchungshandschuhe (Safe Skin Nitrile) | Kimberly-Clark, Koblenz, Deutschland | |
| DNase freie Pipettenspitzen 10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl | Kisker, Steinfurt, Deutschland | DNA/RNA Extraktion und PCR |
| DNase freie Reaktionsgefäße 0,2ml, 1,5 ml, 2 ml | Kisker | |
| Untersuchungshandschuhe (Safe Skin PFE) | Kimberly-Clark | |
| Sterile Einmal-Skalpelle Gr.10 | Braun | |
| Sterile Einmalkanülen 21G | Braun | |
| 96-Well-Multiplates, transparent, mit Verschlussfolie | BioRad, München, Deutschland | |

Tabelle 3. Verbrauchsmaterialien

3.2.2. Enzyme

| Bezeichnung | Lieferant | Verwendung |
|---------------------------------|--|---------------------------------------|
| Proteinase K (20 mg/ml) | Qiagen, Hilden, Deutschland | DNA/RNA Extraktion |
| Lysozyme (10 mg/ml) | Applichem, Darmstadt, Deutschland | |
| Ampli Taq Gold | Applied Biosystems, Frankfurt, Deutschland | PCR/Sequenzierung |
| KOD Hot Start DNA Polymerase | Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland | |
| QuantiTec Reverse Transkriptase | Qiagen | Reverse Transkription der RNA in cDNA |

Tabelle 4. Enzyme

3.2.3. Nukleinsäuren und Nukleotide

| Bezeichnung | Sequenz | Lieferant | Verwendung |
|---|--|--|--------------------------------|
| 100 bp DNA-Leiter | nicht vorhanden | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland | Gel-Elektrophorese |
| dNTP's | nicht vorhanden | Applied Biosystems | PCR |
| Primer RL-F2 | 5' ACCTGATGTTATCCCTTGCAC 3' | Eurofins, München, Deutschland | Konventionelle RLEP PCR |
| Primer RL-R2 | 5' CGCTAGAAGGTTGCCGTATG 3' | Eurofins | |
| Primer RLEP-F, nach Truman et al. (114) | 5' GCAGTA TCGTGTTAGTGAA 3' | TibMolBiol, Berlin, Deutschland | RLEP qPCR |
| Primer RLEP-R, nach Truman et al. (114) | 5' GCTAGAAG GTTGCCGTATG 3' | TibMolBiol | |
| Sonde RLEP-P, nach Truman et al. (114) | 5' 6FAM-CGCCGACGG CCGGATCAT CGA-BBQ 3' | TibMolBiol | |
| Primer TTC-A, nach Banerjee et al. (110) | 5' GGACCTAAA CCATCCCGTTT 3 | Eurofins | Konventionelle TTC PCR |
| Primer TTC-B, nach Banerjee et al. (110) | 5' CTACAGGGG GCACTTAGCTC 3' | Eurofins | |
| Primer TTC-F | 5' GACTTAGACGACATCGGCGAG 3' | TibMolBiol | TTC qPCR |
| Primer TTC-R | 5' CTACAGGGGGCACTTAGCTC 3' | TibMolBiol | |
| Sonde TTC-P long | 6FAM- CCgACgggAATAAgTTTAgCATTgA A—BBQ. | TibMolBiol | |
| Primer 16S clonF | 5' GGCTCAGGACGAACGCTG 3' | GenExpress, Berlin, Deutschland | Konventionelle 16S rRNA PCR |
| Primer 16S clonR2 | 5' GTCAATCCGAGAAAACCCAGA C 3' | GenExpress | |

| | | | |
|---|--|--------------------|-----------------------------------|
| Primer ML 16SrRNA TaqF, nach Martinez et al. (62) | 5' GCA TGT CTT GTG GTG GAA AGC 3' | TibMolBiol | 16S rRNA RT- qPCR |
| Primer ML 16SrRNA TaqR, nach Martinez et al. (62) | 5' CAC CCC ACC AAC AAG CTG AT 3' | TibMolBiol | |
| Sonde ML 16STP2, nach Martinez et al. (62) | 5' 6FAM-CCA TCC TGC ACC GCA AAA A-BBQ 3' | TibMolBiol | |
| Primer GAPDH fwd, nach Janssen et al. (163) | 5' GAAGGTGAAGGTCGGAGTC 3' | TibMolBiol | GAPDH mRNA (RT) qPCR |
| Primer GAPDH rev, nach Janssen et al. (163) | 5' GAAGATGGTGATGGGATTTC 3' | TibMolBiol | |
| Sonde GAPDH TM, nach Janssen et al. (163) | 5' FAM- CAAGCTTCCCGTTCTCAGCCT- BBQ 3' | TibMolBiol | |
| Plasmid Standard RLEP | siehe Anhang (Abbildung 10. Sequenz RLEP Gen Standard) | GenExpress | RLEP/TTC qPCR 16S rRNA RT-qPCR |
| Plasmid Standard TTC | siehe Anhang (Abbildung 11. Sequenz TTC Gen Standard) | GenExpress | |
| Plasmid Standard 16S rRNA | siehe Anhang (Abbildung 12. Sequenz 16S rRNA Gen Standard) | GenExpress | |
| TaqMan exogenous internal positive control (IPC) | nicht verfügbar | Applied Biosystems | |

Tabelle 5. Nukleinsäuren und Nukleotide

3.2.4. Geräte

| Bezeichnung | Hersteller | Modell/Seriennummer |
|-------------------------------|------------------------------------|------------------------|
| Arbeitsbank ClanLaf, steril | Eppendorf, Hamburg, Deutschland | VRF 1206 |
| Drucker | Canon, Krefeld, Deutschland | LBP-800 |
| Kühlschrank | Liebherr, Biberach, Deutschland | KT 1414; Model 760024 |
| Kühlschrank | Bosch, Stuttgart, Deutschland | KS 155 TA 1F |
| Kühlschrank | Siemens, München, Deutschland | KG KT RR 16A |
| Mikrowelle | Privileg, Stuttgart, Deutschland | 8017 E |
| Eisflockenbereiter | Scotsman, Mailand, Italien | AF 80 AS, DD6798 |
| Tiefkühlschrank | AEG, Nürnberg, Deutschland | KS155TA |
| Tiefkühlschrank | Liebherr | GP 1456 Mod. 461494 |
| Tiefkühlschrank | Liebherr | GSS 3666; |
| Thermocycler CFX99 | BioRad | |
| Ultraviolett Transilluminator | UniEquip, Planegg, Deutschland | UT 1150207 |
| Vortex | Reamix, Sondheim, Deutschland | Assistent Reamix 2789 |
| Vortex | neoLab, Heidelberg, Deutschland | Vortex Genie, K-550-GE |
| Netzteil (Gelkammer) | BioRad | Power Pack 300 |

Tabelle 6. Geräte

3.2.5. Materialien zur standardisierten Probenentnahme

| Bezeichnung | Hersteller/Lieferant | Verwendung |
|---|---|--|
| Händedesinfektionsmittel | Bode Chemie, Hamburg, Deutschland | Untersuchung, Arbeitshygiene |
| Einmalhandschuhe | Paul Hartmann, Heidenheim, Deutschland | Untersuchung, Probenabnahme |
| Mybudget Abstrichtupfer | Bio-Budget, Krefeld, Deutschland | Nasenabstrich |
| Etiketten selbstklebend | Herma, Filderstadt-Bonlanden, Deutschland | Kennzeichnung der Transportgefäße für Probenmaterial |
| Druckverschlussbeutel | Rajapack, Ettlingen, Deutschland | Probentransport |
| Zell-Lysepuffer (CLS) | Qiagen | Transportmedium für Probenmaterial |
| Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixinsäure, Trimethoprim, Azlocillin (PANTA) Transportmedium | BD, Heidelberg, Deutschland | |
| Ribonukleinsäure <i>later</i> (RNA <i>later</i>) | Qiagen | |
| Gewebe-Lysepuffer (TLS) | Bio-Budget | |
| Mikroschraubröhrchen 2,0 ml | Kisker Biotech | |

Tabelle 7. Materialien zur standardisierten Probenabnahme

3.2.6. Chemikalien

| Bezeichnung | Lieferant | Verwendung |
|--------------------------|-----------|--------------------|
| 2-Propanol (Isopropanol) | AppliChem | DNA/RNA Extraktion |

| | | |
|---|----------------|--------------------|
| AW1 buffer ³ | Qiagen | DNA/RNA Extraktion |
| AW2 buffer ³ | Qiagen | |
| Beta-(2)-Mercaptoethanol, | AppliChem | |
| Binding buffer (TBS) ² | Bio-Budget | |
| DNA Hydration solution (DNA Hyd.) ¹ | Qiagen | |
| EB buffer ³ | Qiagen | |
| Ethanol 70% | AppliChem | |
| Ethanol 96% | AppliChem | |
| Elution buffer ² | Bio-Budget | |
| Tissue lysis buffer (TLS) ² | Bio-Budget | |
| Protein Precipitation Solution (PPS) ¹ | Qiagen | |
| RLT Plus buffer ³ | Qiagen | |
| RPE buffer ³ | Qiagen | |
| RW1 buffer ³ | Qiagen | |
| Washing buffer 1 (HS) ² | Bio-Budget | |
| Washing buffer 2 (MS) ² | Bio-Budget | |
| Agarose Gen-Technologie- Qualität (GTQ) | Carl Roth | PCR |
| Blue Juice 10 x | Invitrogen | |
| Entmineralisiertes Wasser | Anlage im Haus | |

| | | |
|--|-----------------------------|-----------------------------------|
| Gel Red Nucleic Acid Stain | Biotium, Hayward, USA | |
| TaqMan Universal PCR Master Mix | Applied Biosystems | |
| Tris-Acetat-EDTA (TAE) buffer light | Carl Roth | |
| Diethylpyrocarbonate (DEPC) Wasser | Carl Roth | PCR und DNA/RNA Extraktion |
| BBL MGIT PANTA | BD, Heidelberg, Deutschland | Herstellung PANTA Transportmedium |
| Dubos Broth Base | BD | |
| Dubos Medium Albumin | BD | |
| Glycerol (1,2,3-Propantriol) 99.5% | Roth | |
| Hypochlorid (NaOCl x H ₂ O) | Nalgene, Roskilde, Dänemark | Flächenreinigung |

Tabelle 8. Chemikalien

¹ Im DNA Extraktions Kit 'Gentra Puregene' (Qiagen) für CLS enthalten

² Im DNA Extraktions Kit 'My Budget DNA extraction kit mini' (Bio-Budget) für TLS enthalten

³ Im 'AllPrep DNA/RNA Micro Kit' (Qiagen) enthalten für Proben in RNA_{later} und PANTA

3.2.7. Diagnostisches Probenmaterial

Die Etablierung der konventionellen RLEP, TTC und 16S rRNA PCRs erfolgte anhand von togoischen *M. leprae* Patientenproben, welche bereits in der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin (AITM) des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität zu München vorrätig waren. Im Einverständnis mit dem „Programme National de Lutte contre l'Ulcère de Buruli, la Lèpre et le Pian“ (PNLUB-LP), Ministère de la Santé“ in Togo und nach Einwilligung der Patienten waren diese Proben von der DAHW Togo an die AITM zur Qualitätskontrolle der klinischen Diagnose mittels PCR geschickt worden.

Insgesamt wurden 6 DNA Extrakte aus Nasenabstrichen von 2 klinisch diagnostizierten MB Patienten aus Togo verwendet (Tabelle 9. Zur Etablierung verwendete Patientenproben im

Transportpuffer CLS) zur Entwicklung konventioneller PCRs und der Generierung von *M. leprae* Sequenzdaten aus Togo. Auf Grundlage dessen, wurden qPCR Primer und Sonden für die bestätigten Gensequenzen designed. Ob die entwickelten qPCRs auch zum Nachweis von *M. leprae* aus Togo geeignet sind und den gestellten technischen Anforderungen entsprechen, wurde zunächst im Rahmen der technischen Validierung getestet. Hierzu erfolgte die Bestimmung der Sensitivität, Spezifität und der Intra-/Interassay Variabilität sowie der Effizienz (siehe 3.1.). Anschließend wurden die Nachweisverfahren klinisch, anhand von Nasenabstrichen von Lepra-Patienten, validiert. Zur Durchführung der Validierung anhand klinischer Proben wurden die unter 3.3.7.4. aufgeführten Proben verwendet.

Die zur Spezifitätsprüfung verwendeten DNA Extrakte (fakultativ) humanpathogener bzw. ubiquitärer Mykobakterienspezies und Hautkeime wurden von dem nationalen Referenzzentrum für Mykobakterien (Borstel; NRZ) und vom Max von Pettenkofer-Institut (MVP) der Ludwig-Maximilians-Universität, München zur Verfügung gestellt (Tabelle 10. Zur Spezifitätsprüfung verwendete Bakterienspezies und deren Herkunft).

| MB Lepra-Patient | Patientenprobe | Probenart | Entnahmestelle | Ursprungsland |
|------------------|----------------|---------------|----------------------|---------------|
| TL.001 | TL.001.SN.1L | Nasenabstrich | Cavum nasi links | Togo |
| | TL.001.SN.2L | Nasenabstrich | Cavum nasi links | Togo |
| | TL.001.SN.3R | Nasenabstrich | Cavum nasi rechts | Togo |
| | TL.001.SN.4R | Nasenabstrich | Cavum nasi rechts | Togo |
| TL.002 | TL.002.SN.1L | Nasenabstrich | Cavum nasi links | Togo |
| | TL.002.SN.2L | Nasenabstrich | Cavum nasi links | Togo |

Tabelle 9. Zur Etablierung verwendete Patientenproben im Transportpuffer CLS

| Bakterienspezies (durch DNA Sequenzierung bestätigt) | Herkunft | Material |
|--|-----------------|-----------------|
| <i>Escherichia coli</i> | MVP | Humanisolat |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | MVP | Humanisolat |
| <i>Propionibacterium acnes</i> | MVP | Humanisolat |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | MVP | Humanisolat |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | MVP | Humanisolat |
| <i>M. goodii</i> | NRZ | Humanisolat |
| <i>M. avium</i> | NRZ | Humanisolat |
| <i>M. abscessus</i> | NRZ | Humanisolat |
| <i>M. kansasii</i> | NRZ | Humanisolat |
| <i>M. xenopi</i> | NRZ | Humanisolat |
| <i>M. fortuitum</i> | NRZ | Humanisolat |
| <i>M. intracellulare</i> | NRZ | Humanisolat |
| <i>M. marinum</i> | NRZ | Humanisolat |
| <i>M. malmoense</i> | NRZ | Humanisolat |
| <i>M. africanum</i> | NRZ | Humanisolat |
| <i>M. bovis</i> | NRZ | Rindisolat |
| <i>M. microti</i> | NRZ | Mausisolat |
| <i>M. tuberculosis</i> | NRZ | Humanisolat |

Tabelle 10. Zur Spezifitätsprüfung verwendete Bakterienspezies und deren Herkunft. MVP = Max von Pettenkofer-Institut, Ludwig-Maximilians-Universität, München; NRZ = Nationales Referenzzentrum für Mykobakterien, Borstel

3.2.8. Computerprogramme

| Bezeichnung | Hersteller/Lieferant | Verwendung |
|---|--|------------------------------|
| DNAsis max 3.0 | MiraiBio Group, South San Francisco, USA | DNA/RNA Sequenzanalyse |
| Excel | Microsoft, Redmond, USA | Statistische Auswertung |
| Stata | College Station, Texas, USA | |
| GenBank (pubmed) | NCBI, Bethesda, USA | In silico Spezifitätstestung |
| Primer Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) | NCBI | |
| Prism 7 | Graphpad Software, La Jolla, USA | Statistische Auswertung |

Tabelle 11. Computerprogramme

3.3 Methoden

3.3.1 Ablauf

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Etablierung konventioneller PCRs (RLEP PCR, TTC PCR und 16S rRNA PCR), einer kombinierten RLEP/TTC qPCR, des RNA basierten Viabilitätsnachweises (16S rRNA RT-qPCR) sowie die technische Validierung dieser Tests in der AITM von mir ausgeführt.

Zur Vorbereitung zweier Aufenthalte in Togo, zur Etablierung der Patientenrekrutierung, Probenentnahme und weiterer Probenverarbeitung im Oktober 2012 und März 2013 wurden von mir die Anleitungen (engl.: „standard operating procedure“, SOP) zur standardisierten Probenentnahme, Datenerfassung, Probentransport, DNA und kombinierter DNA/RNA Extraktion erstellt.

Während zweier Auslandsaufenthalte konnte ich mich aktiv an folgenden Aufgaben beteiligen:

1. Schulungen für medizinisches Personal zur standardisierten Vorgehensweise von Probenentnahme, Probentransport und Dokumentation.
2. Schulung des Laborpersonals am INH zur Vorbereitung der DNA Proben und der kombinierten DNA/RNA Extraktion.
3. Patientenrekrutierung und Erfassung anamnestischer und epidemiologischer Daten mittels studienspezifischer Formulare.
4. Durchführung der kombinierten DNA/RNA Extraktion am INH.

Die anschließende Validierung der Tests anhand klinischer Proben wurde von mir in der AITM durchgeführt.

3.3.2. Vorarbeiten

Die PCR ist ein Verfahren zur spezifischen Amplifikation von DNA Sequenzen aus heterogenen Nukleinsäuregemischen. Durch diese Methode können geringste DNA Mengen eindeutig nachgewiesen werden. (163) (164) In dieser Arbeit wurde die konventionelle RLEP, TTC und 16S rRNA PCR zur Sequenzierung der togoischen *M. leprae* Proben verwendet, um die unter 3.3.2.1. und 3.3.2.2. beschriebenen Zielsequenzen zu prüfen und auf Grundlage der generierten Sequenzen eine qPCR zu entwickeln.

| TTC Sequenz | Anzahl der Wiederholung des TTC Triplets |
|--|--|
| <i>Mycobacterium leprae</i> isolate 25 microsatellite MLTTC sequence | 25 |
| <i>Mycobacterium leprae</i> isolate 27 microsatellite MLTTC sequence | 27 |
| <i>Mycobacterium leprae</i> isolate 28 microsatellite MLTTC sequence | 28 |
| <i>Mycobacterium leprae</i> isolate 32 microsatellite MLTTC sequence | 32 |
| <i>Mycobacterium leprae</i> isolate 37 microsatellite MLTTC sequence | 37 |

Tabelle 12. Anzahl der TTC Wiederholungen der in der NCBI GenBank vorhandenen *M. leprae* Sequenzen

3.3.2.2. Zielsequenzen für RNA basierten Viabilitätsnachweis

Als Zielsequenzen für einen RNA basierten Viabilitätsnachweis wurden in Studien bereits die Sequenzen der 16S rRNA und sodA mRNA verwendet (siehe 1.6.), wobei die 16S rRNA qPCR mit einer höheren Sensitivität deutlich überlegen war. Daher wurde für den Viabilitätsassay im Rahmen dieser Arbeit die kodierende 16S rRNA Sequenz (463 bp) als lepraspezifisches Element mit einer Halbwertszeit von wenigen Stunden ausgewählt. (62) (127)

Diese RNA Sequenz ist pro *M. leprae* Genom einmal vorhanden und zwei Nukleotidsequenzen sind in der NCBI Genbank aufgelistet: ML0626 (GenBank Zugangsnummer: NC_002677.1) und MLBr_00626 (GenBank Zugangsnummer: NC_011896.1), welche bei der Sequenzanalyse mittels DNAsis max 3.0 zu 100% identische Nukleotidsequenzen aufwiesen:

5'GGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGTCTCTAAAAA
ATCTTTTTTAGAGATACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTGCCCTGCACTTCA
GGGATAAGCTTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACTTCAAGGCGCATGTCTTGTGGTGGAA
AGCTTTTTGCGGTGCAGGATGGGCCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGACGGCCTACCAAG
GCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTACGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
GGGGGATGACGGCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCACCATCGACGAAGGTCTGGGTTTTCTCGGATT
GAC 3'

3.3.2.3. Primer-Design für konventionelle PCRs

RLEP

Für die unter 3.3.2.1. genannte konkordante Zielregion der RLEP Sequenz wurden Primer mit Hilfe der Programme DNAsis max 3.0 und BLASTn designed. Diese Primer schlossen auch den von Truman et al. mittels RLEP qPCR amplifizierten Bereich mit ein. (114) Durch eine BLASTn Analyse wurde außerdem die simultane Amplifikation von menschlichen Genen bzw. Genabschnitten und potentiellen Kontaminanten ausgeschlossen.

Durch die RLEP PCR wird eine 167 Basenpaare umfassende Nukleotidsequenz des unter 3.3.2.1. beschriebenen, nicht kodierenden RLEP Abschnittes amplifiziert (Tabelle 13. RLEP Primer mit zugehöriger Nukleotidposition im *M. leprae* Genom und entsprechender Amplikon Länge).

| Primer | Sequenz (5'-3') | Nukleotidposition | Amplikon Länge |
|--------|----------------------|-------------------|----------------|
| RL-F2 | ACCTGATGTTATCCCTTGAC | 39741- 39761 | 167 bp |
| RL-R2 | CGCTAGAAGGTTGCCGTATG | 39908- 39889 | |

Tabelle 13. RLEP Primer mit zugehöriger Nukleotidposition im *M. leprae* Genom und entsprechender Amplikon Länge.

TTC

Zur Durchführung der konventionellen TTC PCR wurden die von Banerjee et al. veröffentlichten Primer, zur Amplifikation der unter 3.3.2.1. angegebenen Sequenz, verwendet. (110) Durch die TTC PCR wurde ein 173 Basenpaare umfassender Abschnitt der unter 3.3.2.1. beschriebenen repetitiven TTC Sequenz nachgewiesen (Tabelle 14. TTC Primer mit zugehöriger Nukleotidposition im *M. leprae* Genom und entsprechender Amplikon Länge).

| Primer | Sequenz (5'-3') | Nukleotidposition | Amplikon Länge |
|--------|----------------------|-------------------|----------------|
| TTC-A | GGACCTAAACCATCCCGTTT | 2785453-2785472 | 173 bp |
| TTC-B | CTACAGGGGGCACTTAGCTC | 2785299- 2785318 | |

Tabelle 14. TTC Primer mit zugehöriger Nukleotidposition im *M. leprae* Genom und entsprechender Amplikon Länge

16S rRNA

Unter Verwendung der Programme DNAsis max 3.0 und Primer BLASTn wurden Primer für die unter 3.3.2.2. genannte 16S rRNA Sequenz designed, welche auch die von Martinez et al. durch qPCR amplifizierte Sequenz einschließen. (62) Eine Amplifikation menschlicher DNA und potentiell kontaminierender Bakterien wurde in silico durch eine BLASTn Analyse ausgeschlossen. Die konventionelle 16S rRNA PCR wies die im kodierenden Abschnitt des *M. leprae* Genoms befindlichen 462 Basenpaare umfassende unter 3.3.2.2. beschriebene 16S rRNA Nukleotidsequenz nach, die in klinischen Proben 100% spezifisch für *M. leprae* ist (Tabelle 15. 16S Primer mit zugehöriger Nukleotidposition im *M. leprae* Genom und entsprechender Amplikon Länge).

| Primer | Sequenz (5'-3') | Nukleotidposition | Amplikon Länge |
|------------|------------------------|-------------------|----------------|
| 16S clonF | GGCTCAGGACGAACGCTG | 1341206- 1341223 | 462 bp |
| 16S clonR2 | GTCAATCCGAGAAAACCCAGAC | 1341647- 1341668 | |

Tabelle 15. 16S Primer mit zugehöriger Nukleotidposition im *M. leprae* Genom und entsprechender Amplikon Länge

3.3.2.4. qPCR Primer- und Sonden-Design

RLEP

Für die RLEP qPCR wurden die von Truman et al. veröffentlichten Primer und Sonde verwendet. (114) Die RLEP Primer und Hybridisierungssonde wiesen einen 69 Basenpaare umfassenden Abschnitt nach, der auch die unter 3.3.3.1. amplifizierte Nukleotidsequenz beinhaltet (Tabelle 16. RLEP Primer und Hybridisierungssonde mit zugehöriger Nukleotidposition und entsprechender Amplikon Länge).

| Primer/Sonde | Sequenz (5'-3') | Nukleotid Position | Amplikon Länge |
|--------------|-----------------------|--------------------|----------------|
| RLEP-F | GCA GTATCGTGTTAGTGAA | 39839-39857 | 69 bp |
| RLEP-R | CGCTAGAAGGTTGCCGTATG | 39889-39908 | |
| RLEP-P | CGCCGACGCGCGGATCATCGA | 39865-39885 | |

Tabelle 16. RLEP Primer und Hybridisierungssonde mit zugehöriger Nukleotidposition im *M. leprae* Genom und entsprechender Amplikon Länge.

TTC

Mittels DNAsis max 3.0 wurden Primer und eine Hybridisierungssonde für die TTC qPCR designed. Die TTC qPCR amplifizierte einen 115 Basenpaar langen DNA Abschnitt, welcher ebenfalls die unter 3.3.3.2. mittels konventioneller TTC PCR amplifizierte Nukleotidsequenz umfasste (Tabelle 17. TTC Primer und Hybridisierungssonde mit zugehöriger Nukleotidposition im *M. leprae* Genom und entsprechender Amplikon Länge).

| Primer/Sonde | Sequenz (5'-3') | Nukleotid Position | Amplikon Länge |
|--------------|----------------------------|--------------------|----------------|
| TTC-F | GACTTAGACGACATCGGCGAG | 2785394-2785414 | 115 bp |
| TTC-R | CTACAGGGGGCACTTAGCTC | 2785299-2785318 | |
| TTC-P long | CCGACGGGAATAAGTTTAGCATCGAA | 2785335-2785360 | |

Tabelle 17. TTC Primer und Hybridisierungssonde mit zugehöriger Nukleotidposition im *M. leprae* Genom und entsprechender Amplikon Länge.

16S rRNA

Für die 16S rRNA qPCR wurden von Martinez et al. publizierte Primer verwendet. (62) Zu der veröffentlichten Sonde lagen keine Informationen bezüglich des Fluoreszenzfarbstoffes und Löschfarbstoffes (engl.: „quencher“) vor. Außerdem wurde die nur 14 bp umfassende Sonde aus thermodynamischen Gründen modifiziert:

Veröffentlichte Sequenz der Sonde ML16S rRNATaq-Probe: 5' CAT CCT GCA CCG CA 3';
modifizierte Sonde ML 16STP2: 5' 6FAM-CCA TCC TGC ACC GCA AAA A-BBQ 3'
(6FAM = 6-Carboxy-Fluorescein, Reporterfarbstoff; BBQ = BlackBerry® Quencher, Löschfarbstoff).

Die 16S rRNA RT-qPCR amplifiziert einen 70 Basenpaare umfassenden RNA Abschnitt des *M. leprae* Genoms. Da RNA nur eine Halbwertszeit von wenigen Stunden aufweist, dient dieser Assay somit dem Nachweis viabler *M. leprae* Bakterien (Tabelle 18. 16S Primer und Hybridisierungssonde mit zugehöriger Nukleotidposition im *M. leprae* Genom und entsprechender Amplikon Länge).

| Primer/Sonde | Sequenz (5'-3') | Nukleotid Position | Amplikon Länge |
|-----------------|-----------------------|--------------------|----------------|
| ML 16SrRNA TaqF | GCATGTCTTGTGGTGGAAAGC | 1341385-1341405 | 70 bp |
| ML 16SrRNA TaqR | CACCCACCAACAAGCTGAT | 1341436-1341455 | |
| ML 16STP2 | CCATCCTGCACCGCAAAA A | 1341406-1341424 | |

Tabelle 18. 16S Primer und Hybridisierungssonde mit zugehöriger Nukleotidposition im *M. leprae* Genom und entsprechender Amplikon Länge.

3.3.3. Entwicklung und Etablierung der konventionellen PCRs

3.3.3.1. Konventionelle RLEP PCR

Die DNA Extraktion aus dem Transportmedium CLS erfolgte wie unter 3.3.7.7. beschrieben anhand eines modifizierten Protokolls aus dem „Gentra Puregene Handbuch (Qiagen)“ (Tabelle 33. Anleitung zur DNA Extraktion aus Transportpuffer CLS).

Das Reaktionsendvolumen der RLEP PCR setzte sich wie folgt zusammen: 10,3 µl H₂O, 1 µl Primer RL-F2 (0,5 µM), 1 ml Primer RL-F2 (0,5 µM), 2 µl PCR Puffer (100 mM Tris-HCL, 500 mM KCL, pH 8,3), 2 µl MgCl (2,5 mM), 1,6 µl Desoxynukleotidtriphosphat (dNTP, 0,8 mM), 0,1 µl Ampli Taq-Gold DNA Polymerase (0,025 U/µl) und jeweils 2 µl der extrahierten DNA der unter 3.2.7. beschriebenen Patientenproben.

Durchgeführte RLEP Amplifikation: Im Thermocycler folgten auf eine initiale Denaturierung (5 Minuten bei 95°C) 40 Zyklen Denaturierung (15 Sekunden bei 95°C), Primeranlagerung (20 Sekunden bei 55,5°C) und Extension (15 Sekunden bei 72°C). Abschließend wurde nach einer terminalen Extensionsphase (5 Minuten bei 72°C) eine Endtemperatur von 8°C bis zur weiteren Verarbeitung erreicht.

3.3.3.2. Konventionelle TTC PCR

Zur DNA Extraktion wurde ein modifiziertes Protokoll aus dem „Gentra Puregene Handbuch (Qiagen)“, wie unter 3.3.7.7. beschrieben, verwendet (Tabelle 33. Anleitung zur DNA Extraktion aus Transportpuffer CLS).

Das Reaktionsendvolumen der TTC PCR bestand aus folgenden Reagenzien: 10,3 µl H₂O, 1 µl Primer TTC-A (0,5 µM), 1 µl Primer TTC-B (0,5 µM), 2 µl PCR Puffer (100 mM Tris-HCL, 500 mM KCL, pH 8,3), 2 µl MgCl (2,5 mM), 1,6 µl Desoxynukleotidtriphosphat (dNTP) (0,8 mM) 0,1 µl Ampli Taq-Gold DNA Polymerase (0,025 U/µl) und jeweils 2 µl der extrahierten DNA der unter 3.2.7. beschriebenen Patientenproben.

Durchgeführtes TTC Amplifikationsprotokoll: Folgend auf eine initiale Denaturierung (5 Minuten bei 95°C) wurden 40 Zyklen Denaturierung (15 Sekunden bei 95°C), Primeranlagerung (20 Sekunden bei 54°C) und Extension (20 Sekunden bei 72°C) durchgeführt. Nach einer terminalen Extensionsphase (5 Minuten bei 72°C) endete die Reaktion bei einer Endtemperatur von 8°C bis zur weiteren Verarbeitung.

3.3.3.3. Konventionelle 16S rRNA PCR

Zur Extraktion wurde ein modifiziertes Protokoll aus dem „Gentra Puregene Handbuch (Qiagen)“, wie unter 3.3.7.7. beschrieben, verwendet (Tabelle 33. Anleitung zur DNA Extraktion aus Transportpuffer CLS).

Zusammensetzung des Reaktionsendvolumens der 16S rRNA PCR: 11,20 µl H₂O, 1 µl Primer 16S clonF (0,5 µM), 1 µl Primer 16S clonR2 (0,5 µM), 2 µl PCR Puffer (100 mM Tris-HCL, 500 mM KCL, pH 8,3), 1,2 µl MgCl (1,5 mM), 2 µl Desoxynukleotidtriphosphat (dNTP) (0,8 mM) 0,4 µl KOD Hot Start Polymerase (0,02 U/µl) und jeweils 2 µl der extrahierten DNA der unter 3.2.7. beschriebenen Patientenproben. Das durchgeführte 16S rRNA (DNA) Amplifikationsprotokoll: Einer initialen Denaturierung (5 Minuten bei 95°C), schlossen sich 40 Zyklen Denaturierung (20 Sekunden bei 95°C), Primeranlagerung (10 Sekunden bei 59°C) und Extensionsphase (12 Sekunden bei 70°C) an. Abschließend wurde nach einer terminalen Extensionsphase (5 Minuten bei 72°C) eine Endtemperatur von 8°C bis zur weiteren Verarbeitung erreicht.

3.3.4. Ergebnisbeurteilung mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die angefärbten DNA Amplifikate wurden gemeinsam mit einem DNA Gelladepuffer (Blue Juice) auf ein 0,5%iges Agarose-Gel (0,01% Nukleinsäure-interkalierender Fluoreszenzfarbstoff [GelRed] und TAE light mit reduziertem Ethylendiamintetraessigsäure-

[EDTA] Gehalt) aufgetragen, um eine direkte DNA Sequenzierung zu ermöglichen. Ein 100 Basenpaare DNA-Längenstandard (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wurde zur Bestimmung der Amplifikatlänge mitgeführt.

Die Amplifikate wurden im elektrischen Feld in der Gelelektrophoresekammer aufgetrennt, die abgetrennte Bande unter UV-Licht sichtbar gemacht und aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Nach Zentrifugation der ausgeschnittenen Banden in Ultrafree DA Säulen (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und DNA Isolierung nach Herstellerangaben (165) erfolgte die direkte DNA Sequenzierung mittels „Cycle Sequencing“, einer Modifizierung der klassischen Sequenziermethode nach Sanger durch den Analytik Dienstleister Eurofins. Als Primer dienten jeweils die Vorwärts-Primer RL-F2, TTC- A bzw. 16S clonF, mit in den Tabellen 13., 14. und 15. angegebenen Sequenzen.

3.3.5. Weiterentwicklung zur (Reverse-Transkriptase) quantitativen Real-Time PCR (qPCR)

Die qPCR ermöglicht, zusätzlich zur spezifischen Amplifikation einer DNA Sequenz, die Quantifizierung der eingesetzten DNA Menge durch Echtzeit Fluoreszenz-Messungen nach jedem PCR Zyklus. Umgesetzt wird dies durch den Einsatz spezifischer Hybridisierungssonden, welche an einem von den Primern eingerahmten Nukleotidabschnitt inserieren.

Bei einer kombinierten qPCR werden zwei verschiedene Nukleotidsequenzen innerhalb eines qPCR Durchlaufes amplifiziert. Die Primerpaare und Sonde befinden sich hierbei in zwei unterschiedlichen Reaktionsansätzen, für welche identische Amplifikationsprotokolle verwendet werden.

3.3.5.1. Kombinierte RLEP/TTC qPCR

Das RLEP-Reaktionsvolumen setzte sich wie folgt zusammen: 8,6µl Diethylpyrocarbonate (DEPC) Wasser, 1 µl Primer RLEP-F (0,5 µM), 1 µl Primer RLEP-R (0,5 µM), 1 µl Hybridisierungssonde RLEP-P (0,2 µM), 4 µl qPCR Mix Plus (0,025 U/µl), 2 µl Exo IPC (interne Positivkontrolle) Mix, 0,4 µl Exo IPC DNA und jeweils 2 µl der extrahierten DNA.

Für die interne Positivkontrolle wurde im Reaktionsvolumen ein kommerzieller Exo IPC Mix (Applied Biosystems, Frankfurt, Deutschland) mit Primern und Sonde für eine entsprechende Kontrollsequenz „Exo IPC DNA“ mitgeführt. Bei negativem PCR Ergebnis konnten so, bei

gleichzeitiger Positivität der internen Positivkontrolle, falsch negative Ergebnisse durch eine Inhibition ausgeschlossen werden.

Zusammensetzung des TTC-Reaktionsvolumens: 8,6 µl DEPC Wasser, 1 µl Primer TTC-F (0,5 µM), 1 µl Primer TTC-R (0,5 µM), 1 µl Hybridisierungssonde TTC-P long (0,2 µM), 4 µl qPCR Mix Plus (0,025 U/µl), 2 µl Exo IPC Mix, 0,4 µl Exo IPC DNA und jeweils 2 µl der extrahierten DNA. Durchgeführtes Amplifikationsprotokoll der kombinierten qPCR: Initiale 15-minütige Denaturierung bei 95°C. Anschließend 40 Zyklen Denaturierung (5 Sekunden bei 95°C) und Anlagerung der Primer (60 Sekunden bei 60°C). Nach jedem Zyklus erfolgte die Fluoreszenz-Messung.

3.3.5.2. RNA basierter Viabilitätsnachweis (16S rRNA RT-qPCR)

Bei dem RNA basierten Viabilitätsnachweis dient die durch Reverse-Transkriptase umgeschriebene RNA in cDNA als Vorlage in der RT-qPCR.

Die 16S rRNA RT-qPCR amplifiziert einen 70 Basenpaare umfassenden RNA Abschnitt des *M. leprae* Genoms. Da RNA nur eine Halbwertszeit von wenigen Stunden aufweist, dient dieser Assay somit dem Nachweis viabler *M. leprae* Bakterien (Tabelle 18. 16S Primer und Hybridisierungssonde mit zugehöriger Nukleotidposition im *M. leprae* Genom und entsprechender Amplikon Länge).

Zusammensetzung des Reaktionsendvolumens: 8,6 µl DEPC Wasser, 1 µl Primer ML 16SrRNA TaqF (0,5 µM), 1 µl Primer ML 16SrRNA TaqR (0,5 µM), 1 µl Sonde ML 16STP2 (0,2 µM), 4 µl qPCR Mix Plus (0,025 U/µl), 2 µl Exo IPC Mix, 0,4 µl Exo IPC DNA und 2 µl der extrahierten DNA.

Durchgeführtes Amplifikationsprotokoll: Initiale 15-minütige Denaturierung bei 95°C, daran anschließende 40 Zyklen Denaturierung (5 Sekunden bei 95°C) und danach folgende Primeranlagerung (60 Sekunden bei 60°C). Nach jedem Zyklus erfolgte die Fluoreszenz-Messung.

3.3.6. Technische Validierung der qPCR

3.3.6.1. Sensitivität

3.3.6.1.1. Bestimmung der RLEP- und TTC-Kopienanzahl pro *M. leprae* Genom (engl.: „copy number variation assay“, CNV)

Um die analytische Sensitivität der RLEP und TTC qPCR zum *M. leprae* DNA Nachweis aus klinischen Proben aus Togo zu bestimmen, musste zunächst die Anzahl der Kopien dieser repetitiven Sequenzen pro *M. leprae* Genom bestimmt werden.

Hierzu ist die Kenntnis der jeweiligen Menge der Zielsequenz in einer definierten Matrice (engl.: „template“) als auch eines Referenzgens nötig, welches exakt einmal pro *M. leprae* Genom vorliegt. Als Referenzgen wurde das 16S rRNA-Gen ausgewählt (PubMed, NCBI). Die vergleichende Analyse von klinischen *M. leprae* DNA Extrakten mit geklonten 16S rRNA-Gen Standards, die in definierter Konzentration in die 16S rRNA qPCR eingesetzt wurden, erlaubte über die Erstellung einer Standardkurve (siehe 3.1.) die exakte Quantifizierung der *M. leprae* Genome in der eingesetzten DNA Menge.

Geklonte RLEP, TTC und 16S rRNA Gen Standards wurden nach Kenntnis der togoischen *M. leprae* Sequenzen (siehe 3.3.2.1, 3.3.2.2. und 4.1.1.) durch die Firma Gen Express hergestellt (im Anhang: Abbildung 10. GenExpress Zertifikat; Abbildung 11. Sequenz RLEP Gen Standard; Abbildung 12. Sequenz TTC Gen Standard; Abbildung 13. Sequenz 16S rRNA Gen Standard).

In einem ersten Schritt wurde zunächst die Anzahl der 16S rRNA Kopien in 2 µl DNA „template“ aus 5 DNA Extrakten (T.A.MB.002.NL.C, T.A.MB.002.NR.C., T.T.MB.010.NL.C, T.T.MB.011.NL.C, T.T.MB.017.NL.C; siehe Tabelle 37. im Anhang) aus Nasenabstrichen von MB Lepra-Patienten bestimmt.

Hierzu wurden 7 unterschiedliche Verdünnungen des klonierten 16S rRNA-Gen-, TTC- und RLEP-Standards (10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 und 10^1 Kopien) der 16S rRNA qPCR, TTC qPCR bzw. der RLEP qPCR zugeführt. Da eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Menge und dem Ct-Wert besteht, (3) konnte bei bekannter „template“-Menge (klonierten Standards) eine Standardkurve konstruiert werden. Anhand dieser Standardkurve konnte mittels folgender Formel die Anzahl der Kopien (16S rRNA-Gen, TTC-repeat und RLEP-repeat) in den unbekannten Patienten-DNA Extrakten anhand des Ct-Wertes bestimmt werden:

$$x = (C_t - b)/m$$

(x = Log der unbekannten DNA-Menge, m = Steigung der Geraden, b = y-Achsenabschnitt)

So wurden in jeweils 2 µl der Gesamt-DNA Extrakte von MB Lepra-Patienten die Anzahl der Kopien des 16S rRNA-Gens (1 Kopie = *M. leprae* Genomäquivalent), des „TTC-repeats“ und des „RLEP-repeats“ exakt quantifiziert.

Im nächsten Schritt wurde die Anzahl der TTC- bzw. RLEP-Kopien durch die Anzahl der 16S rRNA-Gen-Kopien (= 1 *M. leprae* Genomäquivalent) dividiert, um die Anzahl der TTC- bzw. RLEP-Wiederholungen pro *M. leprae* Genom zu berechnen.

3.3.6.1.2. Bestimmung der analytischen Sensitivität der RLEP, TTC und 16S rRNA qPCRs (LOD)

In dieser Arbeit wurde die analytische Sensitivität anhand der unteren Nachweisgrenze (engl.: „limit of detection“; LOD) bestimmt, bis zu der ein an einer spezifischen Erkrankung leidender Patient noch zuverlässig als solcher („richtig positiv“) diagnostiziert wird. Die Zahl des theoretisch kleinstmöglichen LOD beläuft sich auf 3 (c)DNA Kopien, eine Poisson'sche Verteilung und eine 95%ige Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein einer Kopie in der PCR vorausgesetzt.

Hierzu wurden Verdünnungsreihen de-novo synthetisierter RLEP-, TTC- und 16S rRNA Plasmid-Standards verwendet und jeweils 10 Aliquots einer Verdünnungsreihe in die entsprechende qPCR eingesetzt.

3.3.6.2. Spezifität

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die RLEP, TTC und 16S rRNA qPCR mit folgenden (fakultativ) humanpathogenen bzw. ubiquitären Mykobakterienspezies und auch in der Nase vorkommenden Hautkeimen durchgeführt: *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *M. goodii*, *M. avium*, *M. abscessus*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. fortuitum*, *M. intracellulare*, *M. marinum*, *M. malmoense*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti* und *M. tuberculosis* (Tabelle 10. Zur Spezifitätsprüfung verwendete Bakterienspezies und deren Herkunft).

3.3.6.3. Intraassay und Interassay Variabilität

Zur Bestimmung der Intraassay Variabilität wurde jeweils dreimal die gleiche Verdünnung (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7) einer Probe des RLEP, TTC und 16S rRNA Plasmid-Standards innerhalb eines Versuchsansatzes in die PCR eingesetzt.

Zur Bestimmung der Interassay Variabilität wurde eine Probe in verschiedenen Versuchsansätzen untersucht. Die RLEP, TTC und 16S rRNA qPCRs wurden hierzu mit verschiedenen Verdünnungsreihen (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7) der jeweiligen Plasmid-Standards an drei unterschiedlichen Tagen durchgeführt.

3.3.7. Validierung anhand klinischer Proben

3.3.7.1. Ethische Voraussetzungen

Die Durchführung der Studie „Molecular Diagnosis of Leprosy“ wurde von der togoischen Ethikkommission „Comité de Bioéthique pour la Recherche en Santé [CBRS], Ministère de la Santé, Lomé“ 2012 genehmigt (Ethikvotum N°2807/2012/MS/CAB/DGS/DPLET/CBRS; im Anhang: Abbildung 17.,18.,19. Ethikvotum).

Die Patienten wurden vor Einschluss in die Studie über das genaue Procedere der Probenentnahme und deren weitere Verwendung in der Landessprache oder durch Übersetzer in der jeweiligen Stamessprache aufgeklärt. Außerdem wurde von den Patienten oder deren gesetzlichen Vertretern eine Patienteneinverständniserklärung (engl.: „informed consent form“, ICF) mit Unterschrift oder bei Analphabeten per Daumenabdruck, wie von der Ethikkommission empfohlen, unterzeichnet (im Anhang: Abbildung 14.,15.,16. Patienteneinverständniserklärung). Hierdurch stimmten die Patienten der Probenentnahme, deren anonymisierter Datenerfassung, Datenarchivierung und weiterer labordiagnostischer Testung zu.

3.3.7.2. Patientenrekrutierung durch „active case-finding“

Im Rahmen nationaler Leprakontrollprogramme ist eine frühzeitige Diagnosestellung und Behandlung häufig nicht möglich, da auch bei seit Monaten oder Jahren bestehenden klinischen Symptomen oftmals erst spät ein Arzt konsultiert oder eine Fehldiagnose gestellt wird (30) (166). Daher wurde im Rahmen dieses Projektes den Empfehlungen der ILEP und WHO folgend eine aktive Fallfindung in Togo etabliert. (31) (36) (88) (156)

Auf Strukturen vorausgegangener Projekte zum Buruli Ulkus (zwei von der Europäischen Kommission geförderte Studien im Rahmenprogramm „FP6“ und „FP7“) basierend, erfolgte die aktive Rekrutierung der Patienten im Rahmen des nationalen dezentralisierten Leprakontrollprogramms PNLUB-LP, durchgeführt durch die DAHW in Togo (DAHW-T).

Togo ist in sechs Gesundheitsdistrikte („Lomé Commune“, „Maritime“, „Plateaux“, „Centrale“, „Kara“ und „Savanes“) unterteilt, welche wiederum in 40 lokale Gesundheitsbezirke aufgeteilt sind. Für die Identifizierung, kostenlose Behandlung und medizinische Betreuung von Lepra- und Tuberkulosepatienten ist in jedem dieser Bezirke mindestens ein Tuberkulose- und Leprakontrolleur „Contrôleurs Lèpre-TB“ (CLT) zuständig, welcher den regionalen Leprakontrolleuren (CLT-R) untersteht.

Sechs ausgewählte Teams, bestehend aus einem CLT und einem CLT-R pro Gesundheitsdistrikt, wurden speziell für die Patientenrekrutierung und Probenentnahme von der DAHW-T im Rahmen dieses Projektes geschult. Durch ein spezielles Mobilfunknetzwerk konnten die CLT's und CLT-Rs ohne Verzögerung die DAHW-T über das Auftreten eines neuen Leprafalls informieren. Nach Meldung eines neuen Lepra-Patienten erfolgte die Bestätigung der klinischen Diagnose, Patientenaufklärung, Probenentnahme und Behandlung durch diese Teams.

3.3.7.3. Einschluss- und Ausschlusskriterien

Zur Teilnahme an der Studie musste eine unterschriebene Patienteneinverständniserklärung vorliegen. Zudem wurden nur klinisch diagnostizierte, multibazilläre Lepra-Patienten mit einem Mindestalter von fünf Jahren und ohne zuvor durchgeführte antimykobakterielle Chemotherapie in die Studie eingeschlossen.

Entsprechende Ausschlusskriterien waren folgende: PB Patienten, jünger als fünf Jahre, antimykobakterielle Vorbehandlung oder die Ablehnung an der Studienteilnahme (Tabelle 19. Einschluss- und Ausschlusskriterien für die Studienteilnahme).

| <u>Einschlusskriterien</u> | <u>Ausschlusskriterien</u> |
|---|---|
| Alle klinisch diagnostizierten MB Lepra-Patienten | PB Patient |
| Mindestens 5 Jahre alt | Jünger als 5 Jahre |
| Antimykobakteriell naiver Patient (neuer Fall) | Begonnene antimykobakterielle Therapie |
| Schriftliche Einwilligung zur Studienteilnahme | Keine Einwilligung zur Studienteilnahme |

Tabelle 19. Ein- und Ausschlusskriterien für die Studienteilnahme

3.3.7.4. Datenerfassung und standardisierte Probenentnahme

Vor der Probenentnahme erfolgte durch die oben beschriebenen geschulten Teams eine ausführliche Anamnese und klinische Untersuchung des Patienten. Folgende Daten wurden erhoben: Alter, Geschlecht und Herkunft der Patienten, klinische Einteilung der Lepraform (MB, PB; wie unter 1.5. beschrieben), durchschnittliche subjektive Dauer der Erkrankung, wissentlicher Kontakt zu anderen Lepra-Patienten, Grad der Behinderung nach WHO (Abbildung 2. Einteilung des Grades der Behinderung bei Beteiligung der Augen und/oder Extremitäten nach WHO). Diese Daten wurden im Datenerhebungsformular "Patient data entry form" (im Anhang: Abbildung 8. Datenerhebungsformular D1) dokumentiert. Die Probenentnahme erfolgte anhand der SOP "Sample Collection from Leprosy Patients" SOP.1c (im Anhang: Abbildung 20.,21.,22.,23.,24. SOP.1c: Probenentnahme).

Zur späteren Evaluation verschiedener Transportmedien wurden pro Patient acht Nasenabstriche entnommen, jeweils einer aus dem rechten und linken Nasenloch in den Transportmedien CLS, TLS, RNA/ater und PANTA (Tabelle 20. Übersicht über die entnommenen Proben in vier zu evaluierenden Transportpuffern pro Lepra-Patient). Zur Stabilisierung von DNA und zur Lyse der Bakterienzelle wurden die Lysepuffer der Hersteller

Qiagen (CLS) und Bio-Budget (TLS) verwendet. Zur Stabilisierung von RNA in den Nasenabstrichen wurden die Transportmedien der Firmen Qiagen (*RNA/ater*) und BD (PANTA) (Zusammensetzung des PANTA Mediums im Anhang: Abbildung 25.,26. [Seiten 1-3] SOP2.b: Weiterverarbeitung der RNA/DNA Proben) verwendet, wobei in PANTA durch Zusatz der Antibiotikamischung BD MGIT™ PANTA™ die bakterielle Begleitflora unterdrückt wird.

Die Probenentnahme erfolgte durch Streichen des Abstrichtupfers mit leichtem Druck über der Schleimhaut besonders im Bereich des Vestibulum nasi, bei rekliniertem Kopf des Patienten. Danach wurde der Tupfer direkt in das Transportröhrchen gegeben. Jede Probe wurde mit einer Patienten-, Proben- und Labornummer versehen und zum Transport in Druckverschlussbeuteln verpackt.

| Patienten | Probenart | Anzahl der Proben | Entnahmestelle | Transportmedium |
|------------------------------|---------------|-------------------|--------------------|-------------------------------|
| 20 unbehandelte MB Patienten | Nasenabstrich | 1 | Cavum nasi rechts | TLS (400µl/Probe) |
| | Nasenabstrich | 1 | Cavum nasi rechts | CLS (700µl/Probe) |
| | Nasenabstrich | 1 | Cavum nasi links | TLS (400µl/Probe) |
| | Nasenabstrich | 1 | Cavum nasi links | CLS (700µl/Probe) |
| | Nasenabstrich | 1 | Cavum nasi rechts | <i>RNA/ater</i> (500µl/Probe) |
| | Nasenabstrich | 1 | Cavum nasi rechts | PANTA (500µl/Probe) |
| | Nasenabstrich | 1 | Cavum nasi links * | <i>RNA/ater</i> (500µl/Probe) |
| | Nasenabstrich | 1 | Cavum nasi links * | PANTA (500µl/Probe) |

Tabelle 20. Übersicht über die entnommenen Proben in vier zu evaluierenden Transportpuffern pro Lepra-Patient; * Rückstell-Proben

3.3.7.5. Datendokumentation

Die im Datenerhebungsformular (im Anhang Abbildung 8. Datenerhebungsformular D1) dokumentierten Patientendaten wurden in pseudonymisierter Form in studienspezifischen Excel Datenauswertungstabellen eingetragen, während die Originale in den medizinischen Akten des INH verblieben. Diese Tabelle diente dem Datenaustausch (Laborergebnisse, pseudonymisierte Patientendaten wie unter 3.3.7.4. beschrieben) zwischen den Projektpartnern DAHW-T, INH und AITM.

3.3.7.6. Probentransport und Weiterverarbeitung am INH und der AITM

Die Proben wurden in aufrechter Position mit der zugehörigen Patienteneinverständniserklärung und dem Datenerhebungsformular zum INH in speziell angefertigten Probenversandtaschen (DAHW-T) transportiert.

Am INH wurden die Patientenproben zum DNA Nachweis im Transportmedium CLS und TLS bei 80°C für 20 min. hitzeinaktiviert und anschließend, bis zum Versand an die AITM, bei 2-8°C gelagert.

Probenmaterial zum Nachweis von *M. leprae* DNA/RNA in RNA*later* und PANTA wurde entsprechend der SOP P2.b (im Anhang: Abbildung 25.,26.,27. Weiterverarbeitung der RNA/DNA Proben) im INH weiterverarbeitet und eine kombinierte DNA/RNA Extraktion durchgeführt. Jeweils ein Nasenabstrich in RNA*later* und PANTA wurde nicht der kombinierten DNA/RNA Extraktion zugeführt, sondern verblieb bei -80°C als Rückstell-Probe am INH. Die entstandene cDNA, eine Kontrolle zum Ausschluss einer Kontamination mit genomischer DNA (wD-cont, wie unter 3.3.8.2. beschrieben), und DNA wurden zusammen mit den CLS und TLS Proben an die AITM per Luftfracht verschickt. Hier erfolgte die Weiterverarbeitung der CLS sowie TLS Proben und die DNA Extraktion (Abbildung 7. Weiterverarbeitung der Proben).

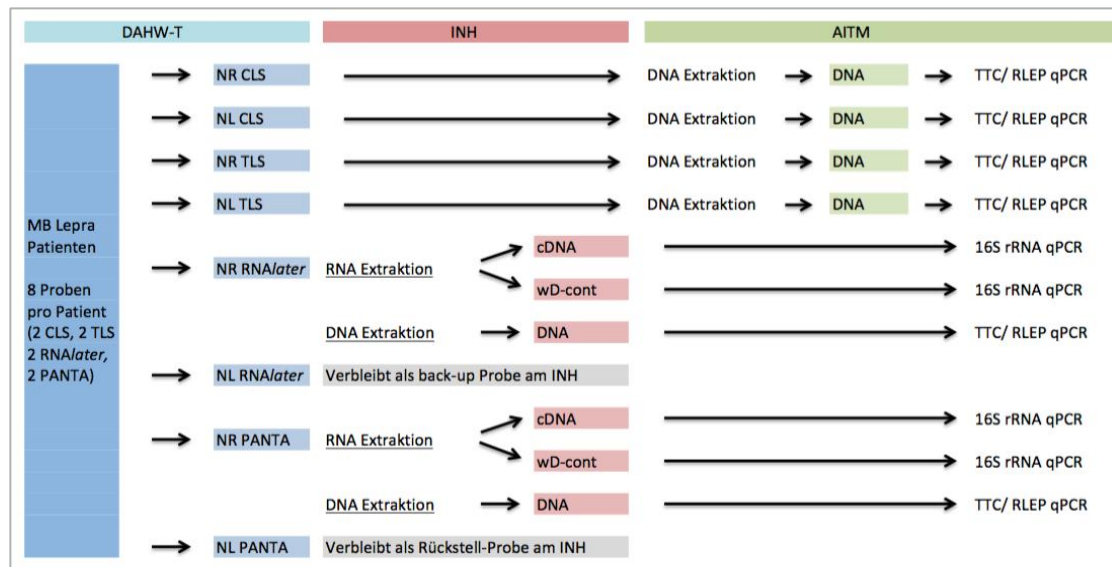


Abbildung 7. Weiterverarbeitung der Proben. DAHW-T = Deutsche Lepra- und Tuberkulosehilfe Togo (Patientenrekrutierung und Probenabnahme). INH = Institut National d’Hygiène (Kombinierte DNA/RNA Extraktion und Aufbewahrung der Rückstell-Proben (engl.: back-up samples). AIMT = Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin des Klinikums der Universität München (DNA Extraktion und Durchführung der PCR). wD-cont = Kontrolle um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen (wie unter 3.3.8.2. beschrieben)

3.3.7.7. Nukleinsäurepräparation aus Patientenmaterial

Zur späteren Evaluation verschiedener Extraktionsmethoden wurden jeweils zwei Nasenabstriche den vier verschiedenen Methoden zur Nukleinsäurepräparation zugeführt.

Die in der AIMT durchgeführte DNA Extraktion aus dem Transportmedium CLS erfolgte mittels eines modifizierten Protokolls aus dem „Gentra Puregene Handbuch (Qiagen)“, wobei die verwendeten Reagenzien CLS, PPS und DNA-Hyd. im Kit enthalten waren. Die Anleitung zur Nukleinsäureextraktion aus CLS befindet sich im Anhang (Tabelle 33. Anleitung zur DNA Extraktion aus Transportpuffer CLS).

Aus dem Transportmedium TLS erfolgte die DNA Extraktion in der AIMT entsprechend eines modifizierten Protokolls des „My Budget DNA Extraction Handbuchs (Bio Budget)“. Hierzu waren die Reagenzien TLS, TBS, „washing buffer 1 (HS)“, „washing buffer 2 (MS)“ und „elution buffer“ im Kit enthalten. Die Anleitung zur DNA Extraktion aus TLS befindet sich im Anhang (Tabelle 34. Anleitung zur DNA Extraktion aus Transportpuffer TLS).

Die extrahierten Nukleinsäuren wurden anschließend durch Hinzugabe von 100 µl DNA-„Hydration Solution“ (Qiagen) rehydriert.

Die kombinierte DNA/RNA Extraktion und reverse Transkription von Gesamt-Transkriptom RNA in cDNA aus den Transportmedien RNAlater und PANTA wurde am INH durchgeführt. Hierzu wurde ein modifiziertes Protokoll des „AllPrep DNA/RNA Handbuch“ (Qiagen) angewendet, wozu sich die Anleitung zur Präparation im Anhang (Tabelle 35. Anleitung zur kombinierten RNA/DNA Extraktion) befindet. Pufferlösungen RLT, RW1, RPE, AW1, AW2, EB, APP und RNAase freies Wasser waren im Kit enthalten.

3.3.7.8. Lagerung der DNA und cDNA Extrakte

Am INH wurden DNA Extrakte aus RNAlater in 2 ml Mikroschraubröhrchen, cDNA Extrakte aus PANTA und RNAlater in 0,2 ml Reaktionsgefäßen für maximal sieben Tage bei 4°C gelagert; die Langzeitlagerung erfolgte bei -20°C. Der Transport der Extrakte zur AIMT erfolgte bei Raumtemperatur mittels Kurrierdienst.

DNA Extrakte aus CLS und TLS wurden, nach Extraktion in der AIMT, in 2 ml Mikroschraubröhrchen bei 4°C für maximal sieben Tage und bei -20°C für längere Zeit gelagert.

3.3.8. Qualitätskontrolle

3.3.8.1. Genotypisierung mittels DNA Sequenzierungen

Für die Genotypisierung der *M. leprae* Patienten-Isolate sollte jeweils mindestens 1 Extrakt aller durch qPCR Analysen bestätigten Patienten der klinischen Validierung mittels Sequenzierung bestätigt werden, somit eine Konkordanz von 100% mit der *M. leprae*-spezifischen RLEP- Sequenz (*M. leprae* Br4923; GenBank Zugangsnummer: FM211192.1) ergeben.

3.3.8.2. Interne Qualitätskontrolle

Zur internen Qualitätskontrolle wurde bei jeder konventionellen PCR eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt.

Bei Durchführung der qPCR wurde ebenso eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt. Die interne Positivkontrolle (engl.: „internal positive control, IPC“) diente dem Ausschluss falsch negativer Ergebnisse durch Inhibition, zudem wurde nach Nukleinsäurepräparation immer eine Extraktionskontrolle in den PCR Analysen mitgeführt.

Bei RNA Extrakten wurde eine Kontrolle zum Ausschluss einer Kontamination durch genomische DNA mitgeführt (engl.: „genomic DNA wipeout control“, wD-cont). Verwendet wurde hierzu ein Aliquot jedes RNA Extraktes vor der reversen Transkription (Tabelle 21. Verwendete Qualitätskontrollen bei der qPCR).

Zur Qualitätskontrolle wurden qPCR negativ getestete TLS, CLS und RNA^{later} (cDNA) Proben mittels einer bereits in der AITM etablierten Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) qPCR getestet.

GAPDH ist ein „Housekeeping“-Gen menschlicher Zellen, welches häufig als Referenzgen zum Nachweis humaner DNA und RNA verwendet wird. Es wird in viablen humanen Zellen hoch exprimiert und ist als konstitutives Gen zur Aufrechterhaltung der Zellfunktion erforderlich. (167) (168) (169) (170)

Diese qPCR detektiert humane Nukleinsäuren als Kontrolle für eine erfolgreiche DNA und RNA Extraktion. (111) (112) RLEP/ TTC qPCR positive DNA Proben wurden nicht mittels GAPDH qPCR untersucht. Auch wurden jene cDNA Proben nicht mittels GAPDH qPCR überprüft, welche durch die 16S rRNA RT-qPCR positiv getestet wurden. Da PANTA weder humanen Zellen noch mRNA konserviert, war eine Detektion humaner GAPDH mRNA aus diesem Medium nicht möglich.

Eine Studie von Bonnet-Duquennoy et al. konnte zeigen, dass besonders geeignete Probenarten für die GAPDH-qPCR humane Keratinozyten und Hautbiopsien waren, sodass der Test im Rahmen dieser Studie auch zur Überprüfung der korrekten Abnahme von Schleimhautabstrichen des Cavum nasi verwendet wurde. (171)

| Kontrolle | Verwendungszweck | Material | | |
|-------------------------------|---|--|-----------------------|--|
| | | TTC qPCR | RLEP qPCR | 16S rRNA RT-qPCR |
| Positivkontrolle | Sicherstellung eines adäquaten PCR Durchlaufes | TTC Plasmid Standard | RLEP Plasmid Standard | 16S rRNA Plasmid Standard |
| Negativkontrolle | Ausschluss einer Kontamination im PCR Reaktionsendvolumen | H ₂ O | | |
| Interne Positivkontrolle | Ausschluss falsch negativer Ergebnisse durch Inhibition | TaqMan interne Positivkontrolle (IPC) | | |
| Negative Extraktionskontrolle | Ausschluss einer Kontamination während der Extraktion | Extrakte | Extrakte | - |
| wD-cont | Ausschluss einer DNA Kontamination der RNA Extrakte | - | - | Aliquot jedes RNA Extraktes vor reverser Transkription |
| GAPDH qPCR | Sicherstellung einer erfolgreichen RNA und DNA Extraktion | Negativ getestete TLS, CLS und RNA/ater Probe wurde mittels GAPDH qPCR überprüft ¹⁾ | | |

Tabelle 21. Verwendete Qualitätskontrollen bei der qPCR. wD-cont = genomic wipeout DNA. GAPDH = Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase. ¹⁾ Das Transportmedium PANTA konserviert keine humane RNA

3.3.9. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten dieser nicht randomisierten Querschnittstudie erfolgte mittels Microsoft Excel (Microsoft Cooperation, Ort, Land), Stata (College Station, Texas, USA) und Prism 7 (Graphpad Software, La Jolla, USA). Als Maß für die Präzision der gewonnenen Daten wurde das 95%-Konfidenzintervall (engl.: „confidence interval“, CI) der jeweiligen Testergebnisse bestimmt. Der p-Wert beschreibt die Wahrscheinlichkeit, dass unter der Annahme der Nullhypothese, die Teststatistik den beobachteten Wert annimmt. Eine statistische Signifikanz besteht, wenn die 95%-Konfidenzintervalle nicht überlappen und der p-Wert kleiner 0,05 ist. (139) (172)

4. Ergebnisse

4.1. Technische Validierung

4.1.1. Sequenzierungsergebnisse der togoischen Proben

Mittels konventioneller PCR (siehe 3.3.3.1, 3.3.3.2 und 3.3.3.3.) und anschließend „Cycle Sequencing“ (siehe 3.3.4) wurden die Sequenzen der togoischen RLEP, TTC und 16S rRNA Abschnitte bestimmt und sind in der Tabelle 22. (Tabelle 22. Togoische Sequenzen der Abschnitte RLEP, TTC und 16S rRNA) aufgeführt.

| | Sequenz (5'-3') | Amplikon Länge |
|---------------------|--|-------------------|
| RLEP | GCACGGTATAACTATTTCGCACCTGATGTTATCCCTTGCAACATTTCTGCCGCTGGTATC GGTGTGCGCGGCTTGTTGACCGGCCCTCAGCCAGCAAGCAGGCATGCCGCCGGGTG CAGCAGTATCGTGTTAGTGAACAGTGCATCGATGATCCGGCCGTGCGCGGCACATAC GGCAACCTTCTAGCGCAGATCAACCACCCACACCCCACCAGCCCACCACAACACCACC CAAACCAAACCAGCAAAAAATAACCACCAAATGACCATCACGACG | 275 bp |
| TTC | CGAAAGCATTCTGGACCTAAACCATCCCCTTTGGGCTCATACGACGTATCCGTTGGG TTCGATCGAATCGACTTAGACGACATCGGCGAGTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTC TTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCAATGCTAACTTATCCCGTCGGCGTGCTATATTATA GGGAGCTAAGTGCCCCCTGTAGCAGGTCCGATGAAGCGCGTTGCCTTGACAACGCC TGGGGTTGGTTCTTCGATCGAG | 258 bp |
| 16S rRNA | GGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAAAGGTCT CTAAAAAATCTTTTTTAGAGATACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAA TCTGCCCTGCACTTCAGGGATAAGCTTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACTT CAAGGCGCATGTCTTGTGGTGGAAAGCTTTTTGCGGTGCAGGATGGGCCCCGCGGCCT ATCAGCTTGTTGGTGGGGTGACGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAG AGGGTGTACGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA GTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATG ACGGCTTTCGGGTGTAAACCTCTTTCACCATCGACGAAGGTCTGGGTTTTCTCGGATT GAC | 463 bp |

Tabelle 22. Togoische Sequenzen der Abschnitte RLEP, TTC und 16S rRNA mit entsprechender Amplikon Länge

4.1.2. Sensitivität

4.1.2.1. Bestimmung der TTC und RLEP Kopienzahl pro *M. leprae* Genom

Die unter 3.3.6.1.1. beschriebene Berechnung ergab durchschnittlich 30 RLEP Kopien pro *M. leprae* Genom aus klinischen Isolaten togoischer Patienten, bei einer minimalen Zahl von 25 und maximal 36 RLEP Wiederholungen (Tabelle 23. Bestimmung der RLEP Kopienzahl). Die Berechnung der TTC Kopienzahl ergab pro togoischem *M. leprae* Genom einen rechnerischen Wert von minimal 0,5 und maximal 0,76 Wiederholungen (Tabelle 24. Bestimmung der TTC Kopienzahl).

| Patient | Probennummer | Kopienzahl des amplifizierten RLEP Produktes | Kopienzahl des amplifizierten 16S rRNA Produktes | RLEP Kopienzahl ¹⁾ |
|------------|------------------|--|--|-------------------------------|
| T.A.MB.002 | T.A.MB.002.NL.C. | 23443 | 928 | 25 |
| | T.A.MB.002.NR.C | 303 | 12 | 25 |
| T.T.MB.010 | T.T.MB.010.NL.C | 4778 | 12 | 36 |
| T.T.MB.011 | T.T.MB.011.NL.C | 31405 | 1085 | 29 |
| T.T.MB.017 | T.T.MB.017.NL.C | 930 | 26 | 36 |

Tabelle 23. Bestimmung der RLEP Kopienzahl wie unter 3.3.6.1.1 beschrieben ¹⁾ Kopienzahl des amplifizierten RLEP Produktes dividiert durch die Anzahl der 16S rRNA Amplifikate

| Patient | Probennummer | Kopienzahl des amplifizierten TTC Produktes | Kopienzahl des amplifizierten 16S rRNA Produktes | TTC Kopienzahl ¹⁾ |
|------------|------------------|---|--|------------------------------|
| T.A.MB.002 | T.A.MB.002.NL.C. | 550 | 928 | 0,6 |
| | T.A.MB.002.NR.C | 6 | 12 | 0,5 |
| T.T.MB.010 | T.T.MB.010.NL.C | 95,6 | 12 | 0,75 |
| T.T.MB.011 | T.T.MB.011.NL.C | 684,3 | 1085 | 0,63 |
| T.T.MB.017 | T.T.MB.017.NL.C | 19,9 | 26 | 0,76 |

Tabelle 24. Bestimmung der TTC Kopienzahl wie unter 3.3.6.1.1 beschrieben. ¹⁾ Kopienzahl des amplifizierten TTC Produktes dividiert durch die Anzahl der 16S rRNA Amplifikate

4.1.2.2. Bestimmung der analytischen Sensitivität der kombinierten RLEP/TTC qPCR und 16S rRNA RT-qPCR (LOD)

Das LOD entsprach 3 RLEP und 16S rRNA Kopien sowie 5 TTC Kopien. Aufgrund der unter 4.1.2.1. beschriebenen Daten war eine Umrechnung in *M. leprae* Genomäquivalente möglich (LOD/ aufgerundeter Mittelwert der Kopienzahl pro *M. leprae* Genom). So entsprach das LOD für die drei qPCRs (bei durchschnittlich 30 RLEP Kopien, einer TTC und einer 16S rRNA Kopie) jeweils:

| | |
|-------------------|--|
| RLEP qPCR: | $3/30 = 0,1$ <i>M. leprae</i> Genomäquivalente |
| TTC qPCR: | $5/1 = 5$ <i>M. leprae</i> Genomäquivalente |
| 16S rRNA RT-qPCR: | $3/1 = 3$ <i>M. leprae</i> Genomäquivalente |

4.1.3. Spezifität

Unter Verwendung der kombinierten RLEP/TTC qPCR und 16S rRNA RT-qPCR konnte keiner der unter 3.2.7. aufgeführten (fakultativ) humanpathogenen bzw. ubiquitären Mykobakterien und Hautkeime nachgewiesen werden. Die Spezifität für *M. leprae* betrug somit 100% für die drei qPCRs (im Anhang: Tabelle 36. Ergebnisse der Spezifitätstestung).

4.1.4. Intraassay und Interassay Variabilität

Die Ergebnisse der Intraassay und Interassay Variabilität entsprachen den unter 3.1. aufgeführten Kriterien der MIQE guidelines.

4.1.4.1 Intraassay Variabilität

Der größte Variationskoeffizient in der Intraassay Variabilität der RLEP qPCR betrug 0,628, bei der TTC qPCR und 16S rRNA RT-qPCR lag dieser bei 0,609 bzw. 0,638 und somit unter dem Grenzwert von 0,65. Die maximale Variation aller getesteten Proben innerhalb einer Testung sollte weniger als 0,35 betragen und wurde auch in den Intraassay Testungen nicht überschritten (Tabelle 25. Ergebnisse der Intraassay Variabilität).

| qPCR | Standard | Ct-Wert Lauf. 1 ¹⁾ | Ct-Wert Lauf. 2 ¹⁾ | Ct-Wert Lauf. 3 ¹⁾ | Ct Std. Abw ²⁾ | CV ³⁾ | Ct Abw max ⁴⁾ |
|-------------|----------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|------------------------------|------------------|-----------------------------|
| RLEP | 2 | 30,66 | 30,50 | 30,42 | 0,122 | 0,40 | 0,240 |
| | 3 | 27,76 | 27,65 | 27,42 | 0,173 | 0,628 | 0,340 |
| | 4 | 24,37 | 24,51 | 24,48 | 0,074 | 0,301 | 0,140 |
| | 5 | 20,65 | 20,79 | 20,72 | 0,070 | 0,338 | 0,140 |
| | 6 | 17,38 | 17,27 | 17,37 | 0,061 | 0,351 | 0,110 |
| | 7 | 14,28 | 14,34 | 14,20 | 0,070 | 0,492 | 0,140 |
| TTC | 2 | 31,69 | 31,65 | 31,72 | 0,035 | 0,111 | 0,070 |
| | 3 | 28,57 | 28,62 | 28,70 | 0,066 | 0,229 | 0,130 |
| | 4 | 25,39 | 25,27 | 25,42 | 0,079 | 0,313 | 0,150 |
| | 5 | 22,20 | 22,08 | 22,35 | 0,135 | 0,609 | 0,270 |
| | 6 | 18,34 | 18,35 | 18,48 | 0,078 | 0,425 | 0,140 |
| 16S rRNA | 1 | 35,05 | 35,34 | 35,37 | 0,177 | 0,501 | 0,320 |
| | 2 | 32,28 | 32,19 | 32,12 | 0,080 | 0,249 | 0,16 |
| | 3 | 28,86 | 28,81 | 28,79 | 0,036 | 0,125 | 0,070 |
| | 4 | 25,22 | 25,41 | 25,35 | 0,097 | 0,383 | 0,19 |
| | 5 | 21,73 | 21,62 | 21,60 | 0,070 | 0,323 | 0,13 |
| | 6 | 18,09 | 10,11 | 18,30 | 0,116 | 0,638 | 0,210 |
| | 7 | 14,35 | 14,42 | 14,41 | 0,038 | 0,263 | 0,070 |

Tabelle 25. Ergebnisse Intraassay Variabilität ¹⁾ Ct-Werte der in gleicher Verdünnung getesteten Proben. ²⁾ Standard Abweichung der Ct-Werte. ³⁾ Variationskoeffizient der in gleicher Verdünnung getesteten Proben eines Versuchsansatzes. ⁴⁾ Max. Variation aller getesteten Proben innerhalb der Testung eines Versuchsansatzes.

4.1.4.2. Interassay Variabilität

Der größte Variationskoeffizient der Interassay Variabilitätstestung betrug 1,503 in der RLEP qPCR, 0,886 in der TTC- und 1,167 in der 16S rRNA (RT)-qPCR. Dieser lag somit unterhalb des maximalen Wertes einer effizienten qPCR von 2,7. Die maximale Variation des RLEP Assays betrug 0,43 und in der TTC- und 16S rRNA (RT)-qPCR 0,35 bzw. 0,41 und lag somit unter dem maximal tolerierbaren Wert von 0,8 (Tabelle 26. Ergebnisse der Interassay Variabilität).

| qPCR | Standard | Ct-Wert Tag 1 ¹⁾ | Ct-Wert Tag 2 ¹⁾ | Ct-Wert Tag 3 ¹⁾ | Ct Std. Abw. ²⁾ | CV ³⁾ | Ct Abw. max ⁴⁾ |
|---------------------|----------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------|------------------------------|
| RLEP | 2 | 30,53 | 30,62 | 30,49 | 0,099 | 0,324 | 0,13 |
| | 3 | 27,61 | 27,42 | 27,34 | 0,178 | 0,649 | 0,25 |
| | 4 | 24,45 | 24,12 | 24,01 | 0,222 | 0,919 | 0,43 |
| | 5 | 20,72 | 20,52 | 20,65 | 0,100 | 0,485 | 0,2 |
| | 6 | 17,34 | 17,14 | 17,01 | 0,158 | 0,922 | 0,33 |
| | 7 | 14,27 | 13,92 | 13,88 | 0,211 | 1,503 | 0,39 |
| TTC | 2 | 31,69 | 31,73 | 31,58 | 0,061 | 0,192 | 0,15 |
| | 3 | 28,63 | 28,58 | 28,29 | 0,155 | 0,544 | 0,34 |
| | 4 | 25,36 | 25,09 | 25,27 | 0,130 | 0,515 | 0,27 |
| | 5 | 22,21 | 22,01 | 22,04 | 0,140 | 0,633 | 0,20 |
| | 6 | 18,39 | 18,33 | 18,04 | 0,162 | 0,886 | 0,35 |
| 16S rRNA | 1 | 35,25 | 35,00 | 35,01 | 0,185 | 0,527 | 0,24 |
| | 2 | 32,20 | 32,13 | 32,17 | 0,113 | 0,351 | 0,04 |
| | 3 | 28,82 | 28,74 | 28,95 | 0,080 | 0,276 | 0,21 |
| | 4 | 25,33 | 25,35 | 25,41 | 0,077 | 0,304 | 0,06 |
| | 5 | 21,65 | 21,60 | 21,54 | 0,077 | 0,357 | 0,13 |
| | 6 | 18,17 | 18,16 | 18,11 | 0,086 | 0,472 | 0,06 |
| | 7 | 14,39 | 14,34 | 14,75 | 0,169 | 1,167 | 0,41 |

Tabelle 26. Ergebnisse der Interassay Variabilität. ¹⁾ Ct-Werte der in gleicher Verdünnung getesteten Proben. ²⁾ Standard Abweichung der Ct-Werte. ³⁾ Variationskoeffizient der in gleicher Verdünnung getesteten Proben verschiedener Versuchsansätze. ⁴⁾ Max. Variation aller getesteten Proben an drei Tagen.

4.1.5. Effizienz der qPCR

Die Steigung der Regressionsgeraden betrug in der RLEP qPCR $y = -3,4$, der TTC qPCR $y = -3,4$ und der 16S rRNA RT-qPCR $y = -3,38$. Diese Werte lagen innerhalb des in den MIQE Richtlinien geforderten Bereiches der Regressionsgeraden zwischen $-3,2$ und $-3,4$ (siehe 3.1.). (162)

4.2. Validierung anhand klinischer Proben

4.2.1. Durchführung der Datenerfassung und standardisierten Probenentnahme

Die Datenerfassung und standardisierte Probenentnahme konnte, wie unter 3.3.7.4. beschrieben, erfolgreich durchgeführt werden. Von 20 klinisch diagnostizierten MB Lepra-Patienten wurden insgesamt 160 Nasenschleimhautabstriche entnommen (Abbildung unter 3.3.7.6.).

4.2.2. Datendokumentation

Die Patientendaten wurden entsprechend 3.3.7.5 in dem Datenerhebungsformular D1 (im Anhang: Abbildung 8. Datenerhebungsformular D1) dokumentiert.

4.2.3. Probenbearbeitung

Die weitere Bearbeitung der Proben wurde entsprechend 3.3.7.6., 3.3.7.7. und 3.3.7.8. durchgeführt. Pro Patient wurde für den Transport in den Medien CLS und TLS jeweils ein Abstrich aus dem rechten und linken Nasenloch entnommen, welcher der kombinierten RLEP/TTC qPCR nach DNA Extraktion zugeführt wurde (CLS: $n = 40$; TLS: $n=40$). Für die Transportmedien PANTA und RNA $later$ wurde jeweils ein Schleimhautabstrich aus dem rechten und linken Cavum nasi entnommen (PANTA: $n = 40$; RNA $later$: $n = 40$). Die kombinierte DNA/RNA Extraktion wurde zunächst für die Proben aus dem rechten Cavum nasi durchgeführt. Der 16S qPCR wurden die cDNA und wD-cont Proben zugeführt (PANTA: $n = 40$; RNA $later$: $n = 40$), während die DNA mittels kombinierter RLEP/TTC qPCR untersucht wurde (PANTA: $n = 20$; RNA $later$: $n = 20$). Zu einem späteren Zeitpunkt wurde auch eine kombinierte

DNA/RNA Extraktion aus den verbleibenden Rückstellproben in PANTA und RNA_{later}, jeweils aus dem linken Cavum nasi, durchgeführt. Wobei die cDNA und wD-cont Proben der 16S qPCR zugeführt wurden (PANTA: n = 40; RNA_{later}: n = 40) und die DNA der RLEP/TTC qPCR (PANTA: n = 20; RNA_{later}: n = 20). Somit standen nach der Extraktion also 240 Proben aus den Transportmedien PANTA und RNA_{later} und 160 Proben aus CLS und TLS zur weiteren Analyse mittels kombinierter RLEP/TTC qPCR (DNA Extrakte) oder 16S rRNA RT-qPCR (cDNA Extrakte) zur Verfügung. Insgesamt wurden bei der klinischen Validierung 320 Proben untersucht.

4.2.3. Studienkollektiv

Gesamtkohorte

20 klinisch diagnostizierte MB Lepra-Patienten wurden in die Studie eingeschlossen. Unter den Patienten befanden sich 13 männliche Probanden (65,0%). Das Durchschnittsalter der Patienten war 37,86 Jahre mit einem Median von 33,5 Jahren und einer Spannweite von 17-95 Jahren. Die Patienten stammten aus 4 togoischen Regionen (Maritime, n = 13; Plateaux, n = 5; Central, n = 1; Kara, n = 1). Die durchschnittliche subjektive Dauer der Erkrankung vor klinischer Diagnosestellung betrug 3,98 Jahre mit einem Median von 2,5 Jahren und einer Spannweite von 0,16–20 Jahren. Insgesamt gaben drei Patienten (15,0%) an, Kontakt zu bekannten Lepra-Patienten zu haben, 17 Patienten (85,0%) hatten keinen wesentlichen Kontakt zu Lepra-Patienten. Unter den Patienten hatten 4 (20%) vorangehend eine BCG Impfung erhalten. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung hatten 8 Patienten (40,0%) keine Behinderungen, 3 (15,0%) Patienten wiesen Grad 1 Behinderungen und 9 Patienten (45,0%) wiesen Grad 2 Behinderungen auf. Unter den in dieser Arbeit eingeschlossenen Patienten befanden sich keine Kinder unter 15 Jahren.

Laborbestätigte Patienten

Das Durchschnittsalter der 15 RLEP qPCR bestätigten Patienten war 36,7 Jahre mit einem Median von 35 Jahren und einer Spannweite von 17-75 Jahren. Die Patienten stammten aus 3 togoischen Regionen (Maritime n = 10; Plateaux n = 4; Central n = 1). Unter den Patienten waren 3 (20%) BCG geimpft, 12 hatten keine nachweisbare BCG Impfung. Die durchschnittliche subjektive Dauer der Erkrankung vor klinischer Diagnosestellung betrug 3,8 Jahre, mit einem Median von 3 Jahren und einer Spannweite von 0,16-20 Jahren. Zwei Patienten (13,0%) gaben an, Kontakt zu bekannten Lepra-Patienten zu haben, 13 Patienten

(86,0%) hatten keinen wesentlichen Kontakt zu Lepra-Patienten. Insgesamt 6 der qPCR bestätigten Patienten (40,0%) hatten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung keine Behinderung, 2 (13,3%) Patienten wiesen Grad 1 Behinderungen und 7 Patienten (46,6%) wiesen Grad 2 Behinderungen auf.

4.2.4. Laborergebnisse der klinischen Validierung

Bis Oktober 2012 erfolgte die Probenentnahme nach ausführlicher Anamnese und klinischer Untersuchung des Patienten. Die DNA Extraktion der Proben aus den Transportmedien CLS und TLS wurde in der AITM durchgeführt. Die DNA/ RNA Extraktion der Patientenproben aus *RNAlater* und PANTA wurden am INH durchgeführt, ausgenommen der Rückstell-Proben (wie unter 3.3.7.6. beschrieben). Die anschließende Analyse mittels kombinierter RLEP/TTC qPCR bzw. 16S rRNA RT-qPCR erfolgte in der AITM (Abbildung 7. Weiterverarbeitung der Proben). Die Rückstell-Proben wurden zu einem späteren Zeitpunkt bearbeitet (*RNAlater* Februar 2013; PANTA: April 2013) (Tabelle 27. Laborergebnisse der klinischen Validierung).

Zur Qualitätskontrolle wurden qPCR negativ getestete Proben wie unter 3.3.8.2. beschrieben mittels GAPDH qPCR in der AITM getestet.

| Anonymisierte Patienten ID | RLEP qPCR ¹⁾ | TTC qPCR ²⁾ | 16S rRNA RT-qPCR ³⁾ | qPCR wD-cont ⁴⁾ | GAPDH qPCR-cDNA ⁵⁾ | GAPDH qPCR – DNA ⁶⁾ |
|----------------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------------|----------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| T.A.MB.001 | pos | neg | pos | neg | ND | ND |
| T.A.MB.002 | pos | pos | pos | neg | ND | ND |
| T.A.MB.003 | pos | neg | pos | neg | ND | ND |
| T.A.MB.004 | pos | neg | pos | neg | ND | ND |
| T.A.MB.005 | pos | neg | neg | neg | pos | ND |
| T.A.MB.006 | pos | neg | neg | neg | pos | ND |
| T.S.MB.007 | pos | neg | neg | neg | pos | ND |
| T.T.MB.010 | pos | pos | pos | neg | ND | ND |
| T.T.MB.011 | pos | pos | pos | neg | ND | ND |
| T.T.MB.012 | neg | neg | neg | neg | pos | pos |
| TA.MB.013 | pos | pos | pos | neg | ND | ND |
| T.T.MB.014 | neg | neg | neg | neg | pos | pos |
| T.T.MB.015 | pos | pos | pos | neg | ND | ND |
| T.T.MB.016 | neg | neg | neg | neg | pos | pos |
| T.T.MB.017 | pos | pos | neg | neg | pos | ND |
| T.T.MB.018 | pos | pos | neg | neg | pos | ND |
| T.T.MB.019 | neg | neg | neg | neg | pos | pos |
| T.T.MB.020 | neg | neg | neg | neg | pos | pos |
| T.T.MB.021 | pos | pos | pos | neg | ND | ND |
| T.T.MB.022 | pos | pos | pos | neg | ND | ND |

Tabelle 27. Laborergebnisse der klinischen Validierung. ID = Kennung; pos = positives Ergebnis; neg = negatives Ergebnis; ND = nicht durchgeführt (cDNA Probe wurde nicht mittels GAPDH qPCR getestet, da 16S rRNA RT-qPCR positiv war; DNA Probe wurde nicht mittels GAPDH qPCR getestet, da RLEP/TTC qPCR positiv war). ¹⁾ Ergebnis der mittels RLEP qPCR getesteten DNA Proben. ²⁾ Ergebnis der mittels TTC qPCR getesteten DNA Proben. ³⁾ Ergebnis der mittels 16S rRNA RT-qPCR getesteten RNA Probe. ⁴⁾ Ergebnis der mittels 16S rRNA RT-qPCR getesteten RNA Extraktionskontrolle zum Ausschluss einer Kontamination durch genomische DNA, wie unter 3.3.8.2. beschrieben. ⁵⁾ GAPDH qPCR Ergebnis der mittels 16S rRNA RT-qPCR negativ getesteten Probe. ⁶⁾ GAPDH qPCR Ergebnis der mittels RLEP qPCR und TTC qPCR negativ getesteten Probe.

4.2.4.1. DNA Nachweis aus 4 Transportmedien (CLS, TLS, RNA_{later} und PANTA) mittels RLEP qPCR

Es wurden insgesamt 40 DNA Extrakte aus dem Transportmedium CLS (Nase rechts, n = 20; Nase links, n = 20) der RLEP qPCR zugeführt. Hiervon waren insgesamt 27/40 DNA Extrakte (67,5%; 95%-CI: 58,08; 81,92) positiv. Von Extrakten der rechten Nase waren 14/20 Extrakte (70,0%) positiv und von Extrakten der linken Nase waren 13/20 Extrakte (65,0%) positiv.

Es wurden insgesamt 15/20 Patienten anhand von Abstrichen aus einem oder beiden Nasenlöchern (75,0%) mittels positiver RLEP qPCR aus CLS-DNA Extrakten laborbestätigt. Hierunter hatten 12/15 Patienten (80,0%) sowohl ein positives Ergebnis aus der Probe der rechten als auch der linken Nase, 3/15 Patienten (20,0%) hatten entweder ein positives Ergebnis der rechten (2/3; 66,7%) oder der linken Nase (1/3; 33,3%). Durch die Testung zweier Nasenabstriche konnte in dem Transportmedium CLS also ein zusätzlicher diagnostischer Gewinn von 20% für die RLEP qPCR erzielt werden (im Anhang: Tabelle 37. qPCR Ergebnisse der klinischen Validierung).

Von DNA Extrakten aus TLS (Nase rechts, n = 20; Nase links, n = 20) wurden 40 Proben der RLEP qPCR zugeführt. Hiervon waren insgesamt 21/40 DNA Extrakte (52,5%; 95%-CI: 39,51; 65,49) positiv. Von Extrakten der rechten Nase waren 10/20 Extrakte (50,0%) positiv und von Extrakten der linken Nase waren 11/20 Extrakte (55,0%) positiv.

Es wurden insgesamt 11/20 Patienten (55,0%) anhand von Abstrichen aus einem oder beiden Nasenlöchern mittels positiver RLEP qPCR aus TLS-DNA Extrakten laborbestätigt. Hierunter hatten 10/11 Patienten (90,9%) sowohl ein positives Ergebnis aus der Probe der rechten als auch der linken Nase, 1/11 Patienten (9,1%) hatte nur ein positives Ergebnis im Extrakt der linken Nase (1/1; 100 %). Durch die Testung zweier Nasenabstriche konnte in dem Transportmedium TLS ein zusätzlicher diagnostischer Gewinn von 9,1% für die RLEP qPCR erzielt werden (im Anhang: Tabelle 37. qPCR Ergebnisse der klinischen Validierung).

Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,001$) der RLEP qPCR Ergebnisse aus CLS und TLS, wobei die Verwendung des Transportmediums CLS mit 27/40 (67,5%) positiv getesteten DNA Extrakten signifikant bessere Ergebnisse verglichen mit TLS (21/40; 52,5% positiv getestete DNA Extrakte) erzielte.

Der RLEP qPCR wurden insgesamt 40 DNA Extrakte, nach kombinierter DNA/RNA Extraktion aus RNA_{later} (Nase rechts, n = 20; Nase links, n = 20), zugeführt. Hiervon waren insgesamt

19/40 DNA Extrakte (47,5%) positiv. Von Extrakten der rechten Nase waren 9/20 Extrakte (45,0%) positiv und von Extrakten der linken Nase waren 10/20 Extrakte (50,0%) positiv.

Es wurden insgesamt 11/20 Patienten (55,0%) anhand von Abstrichen aus einem oder beiden Nasenlöchern mittels positiver RLEP qPCR aus RNA*later*-DNA Extrakten laborbestätigt. Hierunter hatten 8/11 Patienten (72,7%) sowohl ein positives Ergebnis aus der Probe der rechten als auch der linken Nase, 3/11 Patienten (27,3%) hatten entweder ein positives Ergebnis der rechten (1/3; 33,3%) oder der linken Nase (2/3; 66,7%). Durch die Testung zweier Nasenabstriche konnte in dem Transportmedium RNA*later* somit ein zusätzlicher diagnostischer Gewinn von 9,1% für die RLEP qPCR erzielt werden (im Anhang: Tabelle 37. qPCR Ergebnisse der klinischen Validierung).

Es wurden insgesamt 40 DNA Extrakte (Nase rechts, n = 20; Nase links, n = 20), nach kombinierter DNA/RNA Extraktion aus PANTA, der RLEP qPCR zugeführt. Hiervon waren insgesamt 16/40 DNA Extrakte (40,0%) positiv. Es wurden 11/40 Extrakte (55,0%) mittels positiver RLEP qPCR aus PANTA-DNA Extrakten der rechten Nase laborbestätigt. Von Extrakten der linken Nase waren 5/20 Patienten (25,0%) positiv.

Es wurden insgesamt 11/20 Patienten (55,0%) anhand von Abstrichen aus einem oder beiden Nasenlöchern mittels positiver RLEP qPCR aus PANTA-DNA Extrakten laborbestätigt. Hierunter hatten 5/11 Patienten (45,5%) sowohl ein positives Ergebnis aus der Probe der rechten als auch der linken Nase, 6/11 Patienten (54,5%) hatten ein positives Ergebnis der rechten Nase (Tabelle 28. RLEP qPCR Ergebnisse aus den Transportmedien CLS, TLS, RNA*later* und PANTA). Durch die Testung zweier Nasenabstriche konnte in dem Transportmedium PANTA ein zusätzlicher diagnostischer Gewinn von 9,1% für die RLEP qPCR erzielt werden (im Anhang: Tabelle 37. qPCR Ergebnisse der klinischen Validierung).

Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,012$) der RLEP qPCR Ergebnisse aus RNA*later* und PANTA, wobei die Verwendung des Transportmediums RNA*later* mit 19/40 (47,5%) positiv getesteten DNA Extrakten statistisch signifikant bessere Ergebnisse verglichen mit PANTA (16/40; 40% positiv getestete DNA Extrakte) erzielte.

| | | RLEP qPCR positiv | RLEP qPCR negativ |
|-----------------|-----------|-------------------|-------------------|
| CLS | Proben | 27/40 (67,5%) | 13/40 (32,5%) |
| | Patienten | 15/20 (75%) | 5/20 (25%) |
| TLS | Proben | 21/40 (52,5%) | 19/40 (47,5%) |
| | Patienten | 11/20 (55,0%) | 9/20 (45,0%) |
| RNAlater | Proben | 19/40 (47,5%) | 21/40 (52,5%) |
| | Patienten | 11/20 (55,0%) | 9/20 (45,0%) |
| PANTA | Proben | 16/40 (40,0%) | 24/40 (60,0%) |
| | Patienten | 11/20 (55,0%) | 9/20 (45,0%) |

Tabelle 28. RLEP qPCR Ergebnisse aus den Transportmedien CLS, TLS, RNAlater und PANTA zum DNA Nachweis

4.2.4.1.1. Vergleich der RLEP qPCR Ergebnisse von DNA Extrakten aus unterschiedlichen Transportpuffern

Von 20 klinisch diagnostizierten MB Lepra-Patienten wurden insgesamt 15/20 Patienten (75,0%; 95%-CI: 59,07; 90,93) mittels RLEP qPCR aus DNA Extrakten in CLS (15/20; 75,0%), TLS (11/20; 55,0%), RNAlater (11/20; 55,0%) und PANTA (11/20; 55,0%) laborbestätigt. Hierbei wurden alle 11 Patienten, die mittels RLEP qPCR aus TLS-, RNAlater- oder PANTA-DNA Extrakten laborbestätigt wurden, auch mittels CLS-DNA Extrakten positiv getestet; die CLS-DNA Extrakte ergaben bei 4/20 zusätzlichen Patienten (20,0%) ein positives RLEP qPCR Ergebnis (Tabelle 28. RLEP qPCR Ergebnisse aus den Transportmedien CLS, TLS, RNAlater und PANTA). Das Transportmedium CLS weist somit eine höhere Sensitivität, im Vergleich zu den anderen Transportpuffern, zur Detektion von *M. leprae* DNA mittels RLEP qPCR auf.

Von den 15 positiv getesteten Patienten aus CLS Extrakten mittels RLEP qPCR, hatten 9 Patienten sowohl ein positives qPCR Ergebnis aus DNA Extrakten in PANTA, RNAlater und TLS. Jeweils ein Patient der aus CLS positiv getesteten Patienten wurde entweder aus DNA Extrakten der Transportmedien TLS, PANTA oder RNAlater positiv getestet.

4.2.4.2. DNA Nachweis aus 4 Transportmedien (CLS, TLS, RNA_{later} und PANTA) mittels TTC qPCR

Es wurden insgesamt 40 DNA Extrakte aus CLS (Nase rechts, n = 20; Nase links, n = 20) der TTC qPCR zugeführt. Hiervon waren insgesamt 13/40 DNA Extrakte (32,5%) positiv. Von Extrakten der rechten Nase waren 8/20 Extrakte (40,0%) positiv und von der linken Nase waren 5/20 Extrakte (25,0%) positiv.

Es wurden insgesamt 8/20 Patienten (40,0%) anhand von Abstrichen aus einem oder beiden Nasenlöchern mittels positiver TTC qPCR aus CLS-DNA Extrakten laborbestätigt. Hierunter hatten 5/8 Patienten (62,5%) sowohl ein positives Ergebnis aus der Probe der rechten als auch der linken Nase, 3/8 Patienten (37,5%) hatten nur ein positives Ergebnis der rechten Nase. Durch die Testung zweier Nasenabstriche konnte in dem Transportmedium CLS somit ein zusätzlicher diagnostischer Gewinn von 37,5% für die TTC qPCR erzielt werden (im Anhang: Tabelle 37. qPCR Ergebnisse der klinischen Validierung).

Der TTC qPCR wurden insgesamt 40 DNA Extrakte aus dem Transportmedium TLS (Nase rechts, n = 20; Nase links, n = 20) zugeführt. Hiervon waren insgesamt 14/40 DNA Extrakte (35,0%) positiv. Es waren jeweils 7/20 Extrakte (35,0%) der rechten und der linken Nase positiv.

Es wurden insgesamt 7/20 Patienten (35,0%) anhand von Abstrichen aus beiden Nasenlöchern mittels positiver TTC qPCR aus TLS-DNA Extrakten laborbestätigt. Hierunter hatten 100% der Patienten sowohl ein positives Ergebnis aus der Probe der rechten als auch der linken Nase. Durch die Testung zweier Nasenabstriche konnte in dem Transportmedium TLS kein diagnostischer Zugewinn für die TTC qPCR erzielt werden (im Anhang: Tabelle 37. qPCR Ergebnisse der klinischen Validierung).

Es zeigte sich ein kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,661$) der TTC qPCR Ergebnisse aus CLS (13/40; 32,5% positiv getestete DNA Extrakte) und TLS (14/40; 35% positiv getestete DNA Extrakte).

Es wurden 40 DNA Extrakte aus RNA_{later} (Nase rechts, n = 20; Nase links, n = 20) der TTC qPCR zugeführt. Hiervon waren insgesamt 7/40 DNA Extrakte (17,5%) positiv. Von Extrakten der rechten Nase waren 2/20 Extrakte (10,0%) positiv und von Extrakten der linken Nase waren 5/20 (25,0%) positiv.

Es wurden insgesamt 5/20 Patienten (25,0%) anhand von Abstrichen aus einem oder beiden Nasenlöchern mittels positiver TTC qPCR aus RNA_{later}-DNA Extrakten laborbestätigt. Hierunter hatten 2/5 Patienten (40,0%) sowohl ein positives Ergebnis aus der Probe der rechten als auch linken Nase, 3/5 Patienten (60,0%) hatten nur ein positives Ergebnis der linken Nase. Durch die Testung zweier Nasenabstriche konnte in dem Transportmedium RNA_{later} somit ein zusätzlicher diagnostischer Gewinn von 60,0% für die TTC qPCR erzielt werden (im Anhang: Tabelle 37. qPCR Ergebnisse der klinischen Validierung).

Von DNA Extrakten aus PANTA Proben (Nase rechts, n = 20; Nase links, n = 20) wurden insgesamt 40 Proben der TTC qPCR zugeführt. Hiervon waren insgesamt 6/40 DNA Extrakte (15,0%) positiv. Von Extrakten der rechten Nase waren 5/20 Extrakte (25,0%) positiv und von Extrakten der linken Nase war 1/20 Extrakten (5,0%) positiv.

Es wurden insgesamt 5/20 Patienten (25,0%) anhand von Abstrichen aus einem oder beiden Nasenlöchern mittels positiver TTC qPCR aus PANTA-DNA Extrakten laborbestätigt. (Tabelle 29. TTC qPCR Ergebnisse aus den Transportmedien CLS, TLS, RNA_{later} und PANTA). Hierunter hatte ein Patient sowohl ein positives Ergebnis aus der Probe der rechten als auch der linken Nase, 4/5 Patienten (80%) hatten nur ein positives Ergebnis der rechten Nase. Durch die Testung zweier Nasenabstriche konnte in dem Transportmedium PANTA somit ein zusätzlicher diagnostischer Gewinn von 80,0% für die TTC qPCR erzielt werden (im Anhang: Tabelle 37. qPCR Ergebnisse der klinischen Validierung).

Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,570$) der TTC qPCR Ergebnisse aus RNA_{later} (7/40; 17,5% positiv getestete DNA Extrakte) und PANTA (6/40; 15% positiv getestete DNA Extrakte).

| | | TTC qPCR positiv | TTC qPCR negativ |
|-----------------|-----------|------------------|------------------|
| CLS | Proben | 13/40 (32,5%) | 27/40 (67,5%) |
| | Patienten | 8/20 (40,0%) | 12/20 (60,0%) |
| TLS | Proben | 14/40 (35,0%) | 26/40 (65,0%) |
| | Patienten | 7/20 (35,0%) | 13/20 (65,0%) |
| RNAlater | Proben | 7/40 (17,5%) | 33/40 (82,5%) |
| | Patienten | 5/20 (25,0%) | 15/20 (75,0%) |
| PANTA | Proben | 6/40 (15,0%) | 34/40 (85,0%) |
| | Patienten | 5/20 (25,0%) | 15/20 (75,0%) |

Tabelle 29. TTC qPCR Ergebnisse aus den Transportmedien CLS, TLS, RNAlater und PANTA zum DNA Nachweis

4.2.4.2.1. Vergleich der TTC qPCR Ergebnisse von DNA Extrakten aus unterschiedlichen Transportpuffern

Von 20 klinisch diagnostizierten MB Lepra-Patienten wurden insgesamt 9/20 Patienten (45,0%) mittels TTC qPCR aus DNA Extrakten in CLS (8/20; 40,0%), TLS (7/20; 35,0%), RNAlater (5/20; 25,0%) und PANTA (5/20; 25,0%) laborbestätigt. Hierbei wurden 8 dieser 9 Patienten aus CLS Extrakten mittels TTC qPCR positiv getestet. Ein Patient wurde nur mittels TTC qPCR aus TLS DNA Extrakten positiv getestet, wobei die Testung der DNA Extrakte aus CLS, PANTA und RNAlater negativ ausfiel. Alle in RNAlater und PANTA positiv getesteten Patienten wiesen auch ein positives Ergebnis in den CLS DNA Extrakten auf.

Zur Detektion von *M. leprae* DNA mittels TTC qPCR wies das Transportmedium CLS eine höhere Sensitivität, im Vergleich mit den Transportmedien TLS, RNAlater und PANTA, auf.

4.2.4.3. Vergleich der RLEP und TTC qPCR Ergebnisse

Von den klinisch diagnostizierten Patienten wurden insgesamt 15/20 Patienten (75,0%) durch *M. leprae* DNA Nachweis mittels qPCR bestätigt. Hierunter wurden 15/20 Patienten (75,0%) mittels RLEP qPCR und 9/20 Patienten (45,0%) mittels TTC qPCR laborbestätigt. Von 9 Patienten, die mittels TTC qPCR positiv getestet wurden, waren alle Patienten ebenfalls RLEP qPCR positiv.

Die Proben wurden statistisch signifikant häufiger ($p < 0.001$) mittels RLEP qPCR (83/160; 51,8%) positiv getestet, verglichen mit den Ergebnissen der TTC qPCR Testung (40/160; 25,0%).

4.2.4.4. RNA Nachweis aus 2 Transportmedien (*RNAlater* und PANTA) mittels 16S rRNA RT-qPCR

Nach reverser Transkription in cDNA wurden insgesamt 40 RNA Extrakte aus *RNAlater* (Nase rechts, $n = 20$; Nase links, $n = 20$) der 16S rRNA RT-qPCR zugeführt. Hiervon waren insgesamt 13/40 cDNA Extrakte (32,5%; 95%-CI: 20,32; 44,68) positiv; alle wD-cont. Proben ($n = 40$) wurden negativ getestet. Von Extrakten der rechten Nase waren 4/20 Extrakte (20,0%) positiv und von Extrakten der linken Nase waren 9/20 Extrakte (45,0%) positiv.

Es wurden insgesamt 9/20 Patienten (45,0%) mittels positiver 16S rRNA RT-qPCR aus *RNAlater*-RNA-Extrakten von Abstrichen aus einem oder beiden Nasenlöchern laborbestätigt. Hierunter hatten 4/9 Patienten (44,4%) sowohl ein positives Ergebnis aus der Probe der rechten als auch der linken Nase, 5/9 Patienten (55,6%) hatten nur ein positives Ergebnis aus Extrakten der linken Nase. In Bezug auf die RLEP positiv getesteten Patienten ($n = 15$) wurden 9/15 Patienten (60,0%) in der 16S rRNA RT-qPCR positiv getestet. Durch die Testung zweier Nasenabstriche konnte in dem Transportmedium *RNAlater* somit ein zusätzlicher diagnostischer Gewinn von 55,6% für die 16S rRNA RT-qPCR erzielt werden (im Anhang: Tabelle 37. qPCR Ergebnisse der klinischen Validierung).

Es wurden insgesamt 40 RNA Extrakte aus PANTA (Nase rechts, $n = 20$; Nase links, $n = 20$) nach reverser Transkription in cDNA der 16S rRNA RT-qPCR zugeführt. Hiervon waren insgesamt 10/40 cDNA Extrakte (25,0 %; 95%-CI: 13,74; 36,26) positiv; alle wD-cont. Proben ($n = 40$) wurden negativ getestet.

Es wurden insgesamt 6/20 Patienten (30,0%) mittels positiver 16S rRNA RT-qPCR aus PANTA-RNA-Extrakten von Abstrichen aus einem oder beiden Nasenlöchern laborbestätigt. Hierunter hatten 5/6 Patienten (83,3%) sowohl ein positives Ergebnis aus der Probe der rechten als auch der linken Nase, 1/6 Patienten (16,7%) hatte nur ein positives Ergebnis aus Extrakten der linken Nase. Durch die Testung zweier Nasenabstriche konnte in dem Transportmedium PANTA somit ein zusätzlicher diagnostischer Gewinn von 16,7% für die 16S rRNA RT-qPCR erzielt werden (im Anhang: Tabelle 37. qPCR Ergebnisse der klinischen Validierung).

In Bezug auf die RLEP positiv getesteten Patienten (n = 15) wurden 10/15 Patienten (66,7%) in der 16S rRNA RT-qPCR positiv getestet (Tabelle 30. 16S rRNA RT-qPCR Ergebnisse aus den Transportmedien RNA*later* und PANTA).

| | | 16S rRNA RT-qPCR positiv | 16S rRNA RT-qPCR negativ |
|------------------------|--|-----------------------------|-----------------------------|
| RNA<i>later</i> | Proben | 13/40 (32,5%) | 27/40 (67,5%) |
| | Patienten | 9/20 (45,0%) | 11/20 (55,0%) |
| | RLEP qPCR positiv getestete Patienten | 9/15 (66,7%) | 6/15 (33,3%) |
| PANTA | Proben | 10/40 (25,0%) | 30/40 (75,0%) |
| | Patienten | 6/20 (30,0%) | 14/20 (70,0%) |
| | RLEP qPCR positiv getestete Patienten | 6/15 (33,3%) | 9/15 (66,7%) |

Tabelle 30. 16S rRNA RT-qPCR Ergebnisse aus den Transportmedien RNA*later* und PANTA zum *M. leprae* RNA Nachweis

4.2.4.4.1. Vergleich der 16S rRNA RT-qPCR Ergebnisse von RNA Extrakten aus unterschiedlichen Transportpuffern

Unter den 15 laborbestätigten (RLEP-DNA positiven) Lepra-Patienten wurden 10/15 Patienten (66,7%; 95%-CI: 46,64; 86,69) mittels 16S rRNA RT-qPCR positiv aus Nasenschleimhautabstrichen getestet. Bei diesen Patienten konnte also RNA nachgewiesen werden, weshalb aufgrund der geringen Halbwertszeit von RNA auf das Vorhandensein viabler *M. leprae* geschlossen werden kann.

Von 10 RNA positiven Patienten konnten 9 (90%) aus RNA*later* Extrakten mittels 16S rRNA RT-qPCR positiv getestet werden. PANTA RNA Extrakte waren bei 6/10 Patienten (60%) positiv, wobei ein Patient nur in PANTA, nicht aber RNA*later*, mittels 16S rRNA RT-qPCR positiv getestet wurde. Der Vergleich der Transportmedien ergab mehr positive 16S rRNA RT-qPCR Ergebnisse aus RNA*later* Extrakten (13/40; 32,5%) gegenüber PANTA Extrakten (10/40; 25,0%), der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (p=0.058).

4.2.4.5. DNA positive und RNA negative Proben

Durch Quantifizierung der RLEP Kopienzahl, wie unter 3.3.6.1.1. beschrieben, konnte gezeigt werden, dass die Bakterienlast in RLEP qPCR (DNA) positiven, aber 16S rRNA RT-qPCR (RNA) negativen Proben sehr gering war und unterhalb der Nachweisgrenze der 16S rRNA RT-qPCR von 3 *M. leprae* Genomäquivalenten (siehe 4.1.2.2.) lag (Tabelle 31. DNA positive, RNA negative Proben).

| Patient | RLEP qPCR (Ct) | RLEP Kopien pro DNA Extrakt (100 µl) ¹⁾ | Bakterienlast (in 2µl) ²⁾ |
|------------|-----------------|--|---|
| T.A.MB.005 | Positiv (35,37) | 100 | 0,067 |
| T.A.MB.006 | Positiv (35,67) | 81 | 0,054 |
| T.S.MB.007 | Positiv (37,89) | 21 | 0,014 |
| T.T.MB.017 | Positiv (28,83) | 34 | 0,023 |
| T.T.MB.018 | Positiv (34,41) | 140 | 0,093 |

Tabelle 31. DNA positive, RNA negative Proben. ¹⁾ Quantifizierung der RLEP Kopien in 2µl „template“: $x = (Ct - b)/m$ (x = Log unbekannte Zahl der RLEP Kopien, m = Steigung, b = y-Achsenabschnitt; wie unter 3.3.6.1.1. beschrieben). ²⁾ Die Bakterienlast in Genomäquivalenten in Nasenschleimhautabstrichen wurde bestimmt unter der Annahme von 30 RLEP Kopien (durchschnittliche Anzahl in den togoischen Proben) pro *M. leprae* Genom.

4.3. Qualitätskontrolle

4.3.1. Genotypisierung mittels DNA Sequenzierungen

Zur Qualitätskontrolle wurden *M. leprae* Gesamt-DNA Extrakte der 15 RLEP qPCR positiven Patienten wie unter 3.3.4 beschrieben mittels konventioneller, Gel-basierter RLEP PCR amplifiziert und sequenziert. Hiervon ergab die BLASTn-Analyse (PubMed) der togoischen *M. leprae* Isolate bei 15/15 Patienten (100%) die *M. leprae* spezifische RLEP 2,3 und 4 Sequenz.

4.3.2. Interne Positivkontrolle, Positivkontrolle und Negativkontrolle

Während der qPCR Testungen wurden die internen Positivkontrollen durch RLEP-, TTC- und 16S rRNA (RT) qPCR positiv getestet und somit eine Inhibition ausgeschlossen. Alle Positivkontrollen wurden positiv getestet und Negativkontrollen negativ.

4.3.2.1. Ausschluss einer Kontamination der DNA und RNA Extraktion

Eine Kontamination während der DNA Extraktion konnte durch 100% negative Testungen der Extraktionskontrollen mittels RLEP- und TTC- qPCR ausgeschlossen werden. Die wD-cont. Proben der RNA Extrakte wurden mittels 16S RT-qPCR zu 100% negativ getestet, womit eine DNA Kontamination der reversen Transkription ausgeschlossen werden konnte.

4.3.2.2. Qualitätskontrolle der RNA Extraktion und Transkription mittels Nachweis der humanen GAPDH mRNA

Neben dem Mitführen einer Kontrolle zum Ausschluss einer Kontamination während der reversen Transkription wurden alle 16S rRNA RT-qPCR negativ getesteten Proben der GAPDH mRNA qPCR zur Kontrolle der RNA Extraktion zugeführt.

Von 27 16S rRNA negativ getesteten cDNA Extrakten in RNA_{later}, wurden 22 Proben (81%) mittels GAPDH mRNA qPCR positiv getestet (im Anhang: Tabelle 37. qPCR Ergebnisse der klinischen Validierung). Hiermit konnte gezeigt werden, dass die RNA Extraktion in den GAPDH mRNA qPCR positiv getesteten Proben erfolgreich war, wohingegen die RNA Extraktion der 5 GAPDH mRNA qPCR negativ getesteten Proben (T.A.MB.001.NR.R, T.T.MB.016.NR.R, T.T.MB.016.NL.R, T.T.MB.017.NR.R, T.T.MB.017.NL.R) nicht erfolgreich war und somit auch die negative 16S rRNA RT-qPCR Testung dieser Proben erklärt.

Bezogen auf die Patienten wurden insgesamt 5/15 (33,3%) laborbestätigte (RLEP qPCR positiven) Lepra-Patienten mittels 16S rRNA RT-qPCR negativ getestet (T.A.MB.005, T.A.MB.006, T.S.MB.007, T.T.MB.017, T.T.MB.018), wobei 5/5 MB-Patienten (100%) GAPDH mRNA qPCR positiv getestet wurden (im Anhang: Tabelle 37. qPCR Ergebnisse der klinischen Validierung). Dies bedeutet, dass die RNA Extraktion bei 5/5 (100%) Patienten erfolgreich war und nicht als Grund für die negativ getesteten Proben angeführt werden kann. Vielmehr ist

als Ursache für diese negativ getesteten Proben die unter 4.2.4.5 erläuterte geringe Bakterienlast unterhalb der Nachweisgrenze der 16S rRNA RT-qPCR anzunehmen.

4.3.2.3. Qualitätskontrolle der DNA Extraktion mittels Nachweis der humanen GAPDH

Neben dem Mitführen einer Kontrolle zum Ausschluss einer Kontamination während der DNA Extraktion wurden alle RLEP und TTC qPCR negativ getesteten Proben der GAPDH qPCR zur Kontrolle der DNA Extraktion zugeführt.

Im Transportmedium CLS wurden 13 DNA Extrakte sowohl mittels RLEP, als auch TTC qPCR negativ getestet und daher der GAPDH qPCR zugeführt. Alle DNA Extrakte aus CLS (13/13, 100%) wurden positiv getestet, womit die DNA Extraktion erfolgreich war und somit keinen Grund für die negative Testung dieser Proben mittels RLEP und TTC qPCR darstellt (im Anhang: Tabelle 37. qPCR Ergebnisse der klinischen Validierung). Bezogen auf die Patienten wurden in dem Transportmedium CLS insgesamt 5/20 (25%) sowohl mittels RLEP als auch TTC qPCR negativ getestet (T.T.MB.012, T.T.MB.014, T.T.MB.016, T.T.MB.019, T.T.MB.020), wobei 5/5 Lepra-Patienten (100%) mittels GAPDH qPCR positiv getestet wurden und die DNA Extraktion aus CLS somit erfolgreich war.

Im Transportmedium TLS wurden 19 DNA Extrakte sowohl mittels RLEP, als auch TTC qPCR negativ getestet und daher der GAPDH qPCR zugeführt. Hier konnten 18/19 (94,7%) DNA Extrakte in TLS mittels GAPDH qPCR positiv getestet werden (GAPDH qPCR negativ getestete Probe: T.T.MB.014.NL.T). Bezogen auf die Patienten wurden insgesamt 9/20 (45%) sowohl mittels RLEP als auch TTC qPCR negativ getestet (T.A.MB.001, T.A.MB.004, T.A.MB.006, T.S.MB.007, T.T.MB.012, T.T.MB.014, T.T.MB.016, T.T.MB.019, T.T.MB.020), wobei 9/9 Lepra-Patienten (100%) mittels GAPDH qPCR positiv getestet wurden und die DNA Extraktion aus TLS somit erfolgreich war.

5. Diskussion

5.1. Durchführung der Studie „Molecular Diagnosis of Leprosy“ (MDL)

Weltweit stagniert der Abfall der Lepra-Inzidenz mit über 200 000 Neuerkrankungen jährlich, wobei 96% der Fälle in nur 22 hochendemischen Ländern auftreten, welche von der WHO als Schwerpunktländer (engl.: „priority countries“) bezeichnet werden: Indien, Brasilien, Indonesien, Demokratische Republik Kongo, Bangladesch, Nepal, Äthiopien, Myanmar, Nigeria, Tansania, Philippinen, Sri Lanka, Madagaskar, Sudan, Elfenbeinküste, Angola, Ägypten, Mosambik, Südsudan, Komoren, föderierte Staaten von Mikronesien, Kiribati. Hierbei stammen 80% der gemeldeten Fälle aus Indien, Brasilien und Indonesien. (35) Der Anteil der weltweiten Neuerkrankungen in Afrika beträgt 9,7%, Togo zählt hierbei mit durchschnittlich 100 Neuerkrankungen pro Jahr zu den niedrig endemischen Ländern. (28) (35)

Die Anzahl der Grad 2 Behinderungen, welcher als Indikator für den Erfolg der Lepra-Kontrollmaßnahmen verwendet wird, konnte noch nicht auf das von der WHO angesetzte Ziel von weniger als eins pro eine Million gesenkt werden. (88) Der Anteil an Kindern unter den Neuerkrankungen, als Indikator einer anhaltenden Transmission, betrug in Afrika im Jahr 2017 9,5% und weltweit 8,1% und bleibt somit ebenfalls weit hinter den festgelegten WHO Zielen zurück. (35) (36) Im Rahmen der Transmission werden Träger von Leprabakterien ohne klinische Symptomatik unter den Kontaktpersonen, neben unbehandelten Lepraerkrankten (67) (68), als eine bedeutende Infektionsquelle erachtet. (11) (67) (74)

Vor dem Hintergrund nahezu gleichbleibender Prävalenz- und Inzidenzraten und der anhaltenden *M. leprae* Transmission, empfehlen die WHO und ILEP innovative Ansätze zur frühzeitigen Diagnose und Behandlung. Die Untersuchung der HHCs und eine mögliche präventive antimykobakterielle Behandlung stellen hier wichtige Kernpunkte dar. (11) (27) (37) (78) (79) (156) (173) Zur Durchsetzung dieser Ziele wird von vielen Autoren die Entwicklung neuer molekularer Tests empfohlen, wodurch sowohl unbehandelte Patienten frühzeitig diagnostiziert als auch *M. leprae* Träger ohne klinische Manifestation identifiziert werden können. (37) (65) (67) (80) (173)

Bis zum Jahr 2012 bestand die Leprakontrolle in Togo aus einer passiven Fallfindung. Aufgrund begrenzter Ressourcen wurden slit-skin-smears und eine anschließende AFB-Mikroskopie nicht durchgeführt, stattdessen orientierte sich die Diagnosestellung ausschließlich an den

klinischen Manifestationen. (174) Diese überwiegend klinische Orientierung führt häufig zu einer späten Diagnosestellung, aber auch zu zahlreichen falschen Diagnosen. (53) (57) (60) (61)

Um in Togo eine frühzeitige Diagnose der Lepra zu ermöglichen und so dem Problem der anhaltenden Transmission zu begegnen, wurde von der AIM das Projekt „Molecular Diagnosis of Leprosy“ (MDL) in Kooperation mit der DAHW ins Leben gerufen. Als Grundvoraussetzung waren im INH in Togo bereits Laborkapazitäten und geschultes Laborpersonal durch vorausgegangene Projekte zum Buruli Ulkus vorhanden und die Durchführung von Routine PCRs zur Detektion von *M. ulcerans* etabliert. (175) Konkret sollten primär PCR basierte Tests zur Detektion von *M. leprae* DNA und RNA in Endemiegebieten entwickelt und evaluiert werden. Durch die PCR ist ein definitiver Nachweis auch sehr geringer Bakterienlasten möglich, so können Patienten diagnostiziert und auch *M. leprae* Träger ohne klinische Manifestation identifiziert werden. Als Ansatz unserer Arbeitsgruppe bietet die Identifikation von Trägern des Bakteriums mittels DNA Nachweis die Möglichkeit, das individuelle Erkrankungsrisiko durch eine prophylaktische Behandlung zu senken. Zum anderen können Träger viabler *M. leprae*, bei denen ein hohes Risiko besteht die Erkrankung zu übertragen, sowohl unter unbehandelten Patienten als auch unter Bakterienträgern ohne klinische Symptomatik, gezielt identifiziert werden. Zielgerichtete, therapeutische Interventionen bei Patienten sowie prophylaktisch-therapeutische Interventionen bei Bakterienträgern ohne klinische Symptomatik vermögen das Transmissionsrisiko zu senken. Quantifizierung der individuellen Bakterienlast ermöglicht des weiteren Rückschlüsse auf das Übertragungsrisiko von Patienten und *M. leprae* Trägern sowie auf das individuelle Erkrankungsrisiko von Bakterienträgern ohne klinische Symptomatik. Informationen über bakterielle Viabilität und Bakterienlast ermöglichen zudem gezielte, intensivierte Umfelduntersuchungen bei potentiellen Hochrisikotransmittern.

Als Zielsequenzen, zur DNA und RNA Detektion, wurden in dieser Studie die lepraspezifischen Elemente RLEP, TTC und 16S rRNA ausgewählt (siehe 1.7.). Anhand klinischer Proben aus Togo wurde eine kombinierte RLEP/TTC qPCR zum DNA Nachweis und eine 16S rRNA RT-qPCR zur Detektion von RNA evaluiert. Außerdem wurden verschiedene Transportmedien zur Konservierung der Erreger aus Nasenabstrichen (einer gering invasiven Methode, erstmals für *M. leprae* RNA zur Probengewinnung verwendet) und unterschiedliche Methoden zur Extraktion von *M. leprae* DNA und RNA untersucht und verglichen. Hierbei wurde die kombinierte DNA/RNA Extraktion am INH durchgeführt. Die DNA Extraktion erfolgte in der

AITM. Aufgrund der Validierungsergebnisse dieser Arbeit wurde im weiteren Studienverlauf und im Rahmen von Folgestudien, zur Identifizierung von Lepra-Patienten und *M. leprae* Trägern ohne klinische Manifestation, der RLEP Assay zum DNA Nachweis aus dem Transportmedium CLS und die 16S rRNA qPCR zum RNA Nachweis aus RNA_{later} angewandt. Im Rahmen der passiven Fallfindung konsultieren Patienten auch bei seit Monaten oder Jahren bestehenden klinischen Symptomen oftmals erst spät einen Arzt, sodass die frühe Diagnosestellung und Behandlung erschwert wird und zu einer anhaltenden Transmission führt. Die anhaltende Übertragung von *M. leprae* spiegelt sich auch in Togo in dem konstant hohen Anteil an Kindern unter den Neuerkrankungen wieder, konkret lag der Anteil bei 8,0% im Jahr 2009 und noch bei 6,1% im Jahr 2016. (28) So wurde während des Studienzeitraums erfolgreich eine aktive Fallfindung wie unter 3.3.7.2. beschrieben etabliert, welche auch in Folgestudien der eigenen Arbeitsgruppe in der AITM und in Togo Anwendung findet. Unter den in dieser Arbeit eingeschlossenen Patienten befanden sich keine Kinder unter 15 Jahren.

5.2. Aussagekraft, Zuverlässigkeit und Anwendung der qPCR Diagnostik

5.2.1. Kombinierte RLEP/TTC qPCR

Da die vorwiegende Anwendung klinischer Kriterien in der Lepradiagnostik (siehe 1.5 und 1.7) zu zahlreichen falschen Diagnosen führt, (53) (60) (61) stellt der Nachweis von DNA mittels qPCR Technik ein wichtiges Instrument bei schwer zu diagnostizierenden Fällen dar und bietet die Möglichkeit, auch Personen mit geringer Bakterienlast, mit oder ohne klinischem Korrelat, sicher zu detektieren. (11) (63) (97) (72) (81) Zudem bringt die qPCR Technik den mikrobiologischen Aspekt, welcher auch ein Bestandteil der Ridley und Jopling Klassifikation ist, zurück in die Lepradiagnostik. (2) (46)

In dieser Arbeit wurden zum Nachweis von *M. leprae* DNA die repetitiven Elemente RLEP und TTC ausgewählt, welche ausschließlich im Lepra-Genom vorkommen. Erstmals konnte eine RLEP und TTC qPCR für die Untersuchung von Nasenschleimhautabstrichen entwickelt und validiert werden. Von 20 klinisch diagnostizierten MB Lepra-Patienten wurden insgesamt 75% (15/20) mittels RLEP qPCR aus DNA Extrakten von gering invasiven Nasenabstrichen positiv getestet. Die Testung dieser Proben mittels TTC qPCR ergab mit 45% (9/20) positiv getesteten Patienten keinen diagnostischen Zugewinn. Folglich wurde im weiteren Studienverlauf nur die RLEP qPCR zur Diagnostik verwendet.

Im Hinblick auf die in dieser Arbeit etablierten RLEP qPCR wurde die analytische Sensitivität anhand des LOD bestimmt und ergab 3 Kopien, was der theoretisch kleinstmöglichen Kopienzahl entspricht (siehe 3.3.6.1.2.). Da die Zielsequenz RLEP im Durchschnitt 30-fach pro *M. leprae* vorkommt, erfolgte die Umrechnung in Genomäquivalente (siehe 4.1.2.2.). Für die RLEP qPCR entsprach das LOD von 3 Kopien somit 0,1 *M. leprae* Genomäquivalenten. Mit der von Truman et al. entwickelten RLEP qPCR konnten Proben sicher positiv getestet werden, welche mehr als 300 Bakterien enthielten. (114) Durch die Optimierung der Konzentration von Primern, Sonde und qPCR Mix (siehe 3.3.5.1.) konnte die Sensitivität der in dieser Arbeit etablierten qPCR im Vergleich deutlich auf 0,1 *M. leprae* Genomäquivalente verbessert werden. (114) In anderen Studien variierte die Sensitivität der RLEP qPCR in Abhängigkeit von verschiedenen Probenmaterialien zwischen 58% und 81%, wobei die höchste Sensitivitätsrate bei einer Untersuchung von Hautbiopsien mittels RLEP qPCR in Brasilien erzielt wurde. (62) (98) (103) Auch in der klinischen Validierung dieser Arbeit konnte eine ähnlich gute Sensitivität von 75% (15/20 Patienten) unter Verwendung von Nasenschleimhautabstrichen erzielt werden. Trotz der großen Variabilität des verwendeten Probenmaterials und des klinischen Umfeldes in den unterschiedlichen Studien wurde RLEP in einer systematischen Übersichtsarbeit von Tatipally et al. als sensitivster Marker zur Detektion von *M. leprae* beschrieben. (98)

Die Spezifität der RLEP qPCR für die Testung von Nasenschleimhautabstrichen betrug in dieser Arbeit 100%. Auch die Effizienz, Intraassay und Interassay Variabilität erfüllten die in den MIQE guidelines geforderten Kriterien (siehe 3.4.1.4.). (162) Martinez et al. ermittelten bei der Testung von Hautbiopsien mittels RLEP qPCR eine Sensitivität von 91,5% und Spezifität von 73,3%. Zu beachten ist hierbei, dass in dieser Studie eine Multiplex-PCR zur simultanen Detektion zweier Gentargets verwendet wurde. Als Probenmaterial wurden gefrorene Paraffinblöcke verwendet, weshalb zudem eine DNA Degeneration nicht ausgeschlossen werden kann. (62) Ähnliche Sensitivitätsraten von 89,2% bei MB Patienten und 80,3% bei PB Patienten wurden auch von Banerjee et al. für eine Multiplex-PCR anhand von Stanzbiopsien in einer Studie aus Indien ermittelt. (110) Tatipally et al. konnten zeigen, dass durch Verwendung einer Multiplex-PCR deutlich höhere Sensitivitätsraten von bis zu 93% erzielt werden konnten. (98) (104) Auch in dieser Arbeit wurde daher die RLEP qPCR mit einer TTC qPCR kombiniert.

Im Hinblick auf die TTC qPCR ergab die Bestimmung des LOD 5 Kopien, was 5 *M. leprae* Genomäquivalenten entspricht. Der Test war zu 100% *M. leprae* spezifisch und die Intraassay und Interassay Variabilität entsprachen ebenfalls den in den MIQE guidelines geforderten Kriterien (siehe 4.1.4.). (162) Da zuvor noch keine TTC qPCR beschrieben wurde, müssen hier zum Vergleich Daten konventioneller PCR-Verfahren herangezogen werden: Shin et al. entwickelten eine PCR mit einer, wie auch in dieser Arbeit ermittelten, Spezifität von 100%. (129) Eine von Banerjee et al. entwickelte konventionelle RLEP/TTC Multiplex-PCR wies eine Sensitivität von 89,2% an „slit skin smears“ auf, wohingegen in der klinischen Validierung an Nasenschleimhautabstrichen dieser Arbeit eine Sensitivität von 45% (9/20 positiv getestete Patienten) vorlag. Nicht auszuschließen ist jedoch, dass die Ergebnisse von Banerjee et al. besonders auf eine gute Performance der RLEP Komponente zurückzuführen sind. (73)

Es bestand eine große Diskrepanz in der Analyse von Proben der technischen und klinischen Validierung mittels qPCR. Die analytische Sensitivität, Intraassay und Interassay Variabilität wurden anhand von Plasmid-Standards bestimmt, welche von togoischen *M. leprae* gesamt DNA Extrakten generiert wurden. Die Validierung der TTC qPCR wurde mittels 160 klinischer Proben aus Togo durchgeführt. Während die Sensitivität, Intraassay und Interassay Variabilitätstestungen eine sehr gute Effizienz des Testverfahrens nachwiesen, konnte dies durch die Testung der klinischen Proben nicht bestätigt werden. Hier konnten lediglich 45% (9/20 Patienten) positiv getestet werden. Eine mögliche Erklärung könnte eine große Heterogenität des DNA Abschnittes in den togoischen Lepraproben darstellen, wodurch die Anlagerung von Primern und Sonde erschwert und eine effiziente Amplifikation nicht möglich wird (siehe auch 5.3.). Eine weitere Erklärung stellen Sekundärstrukturen der genomischen DNA im TTC Abschnitt dar, wodurch eine effiziente Amplifikation, also die Verdopplung der Amplifikate pro Zyklus, erschwert wurde. (162) (176) Sekundärstrukturen erklären auch die Ergebnisse des „copy number variation assays“, der aufgerundet eine TTC Kopie pro togoischem *M. leprae* Genom aufwies. Die Zahlen variierten zwischen 0,5 und 0,76 - nicht jedes *M. leprae* Genom konnte also während der qPCR amplifiziert werden. Auch steht die ermittelte Anzahl der TTC-Kopien in starkem Kontrast zu den in der Literatur beschriebenen Zahlen zwischen 8 und 37 Kopien aus Humanisolaten. (129) (136) (138)

5.2.2. RNA basierter Viabilitätsnachweis

Während eine qPCR lediglich das Vorhandensein von *M. leprae* DNA nachweist, detektiert der RNA basierte Viabilitätsnachweis lebende, sich replizierende Mykobakterien. Diese Methode kann somit auch zum Behandlungsmonitoring und zur Identifizierung von *M. leprae* Trägern ohne klinische Manifestation eingesetzt werden. (11) (62) (63) (177) Araujo et al. konnten in einer Untersuchung von Kontaktpersonen zeigen, dass der Nachweis von *M. leprae* DNA in Nasenabstrichen und nasalen Biopsien mit einem erhöhten Risiko korrelierte klinische Manifestationen der Lepra zu entwickeln. In dieser Arbeit postulieren die Autoren, dass der Eintritt von *M. leprae* über die oberen Atemwege (insbesondere die Nase) den ersten Schritt der Infektion darstellt und hierauf folgend die zellvermittelte und humorale Immunantwort aktiviert wird. Auf diesem Wege infizierte Zellen gelangen wiederum in die Blutbahn und werden so an die bevorzugten Gebiete, wie Myelin-produzierende Schwann-Zellen, transportiert. (69) Der Nachweis von *M. leprae* RNA in Nasenabstrichen wurde erstmals im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt und bietet durch den Nachweis viabler Bakterien die Möglichkeit einer nicht invasiven Methode zur Identifizierung dieser Risikopersonen.

In dieser Arbeit wurden Nasenschleimhautabstriche von Lepra-Patienten mittels 16S rRNA RT-qPCR getestet. Von den 15 RLEP qPCR laborbestätigten MB Lepra-Patienten, wurden bei 66,7% (10/15) der Patienten viable *M. leprae* nachgewiesen. Erstmals wurde ein Viabilitätstest anhand klinischer, togoischer Lepraproben validiert und *M. leprae* RNA in nicht invasiven Nasenschleimhautabstrichen nachgewiesen. Zuvor wurde lediglich der Nachweis von 16S rRNA in Hautbiopsien mittels RT-qPCR beschrieben.

Die Bestimmung des LODs des RNA basierten Viabilitätsnachweises ergab drei 16S rRNA Kopien und liegt deutlich unterhalb des von Martinez et al. verwendeten Assays mit 30 Kopien. (127) Durch Modifikation der Hybridisierungs-sonde und Zusammensetzung der Konzentration von Primern, Sonde und qPCR Mix (siehe 3.3.5.2.) wurde diese Optimierung erzielt.

Die Spezifität dieses RNA basierten Viabilitätstests betrug 100% für *M. leprae*, welche identisch mit der von Martinez et al. und Rudeeaneksin et al. beschriebenen RT-PCR ist. (111) (127)

Da eine Kultivierung von *M. leprae* in vitro nicht möglich ist, besitzt das Mausmodell aktuell noch immer Relevanz in der Resistenztestung und dem Viabilitätsnachweis (siehe 1.1.). (7) (8)

Der im Rahmen dieser Arbeit etablierte RNA Assay stellt eine Alternative zur Viabilitätskomponente des Mausmodells dar. Aufgrund der guten Ergebnisse in der klinischen Validierung wurde der Test im weiteren Studienverlauf verwendet. In Kombination mit einer Quantifizierung der individuellen Bakterienlast wird so die Überwachung des Therapieverlaufes möglich. Zudem können Rückschlüsse auf das Übertragungs- und auch Erkrankungsrisiko gezogen werden. Denn je höher die Bakterienlast viabler Bakterien, desto größer ist sowohl das Risiko eines *M. leprae* Trägers ohne klinische Manifestation selbst zu erkranken als auch das Risiko eines Patienten oder *M. leprae* Trägers ohne klinische Manifestation ein effizienter Überträger zu sein. (11) (127) (140)

5.2.3. Transportmedien für optimale Probenqualität

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Transportmedien zur Konservierung von *M. leprae* DNA (CLS, TLS) und RNA (RNA*later*, PANTA) verwendet und anschließend evaluiert. Insgesamt konnten die besten qPCR Ergebnisse bei DNA Extrakten des Transportmediums CLS (siehe 4.2.4.1.1, 4.2.4.2.1) und bei RNA Extrakten in RNA*later* (siehe 4.2.4.4.1) erzielt werden, sodass diese Puffer auch im weiteren Verlauf des Forschungsprojektes MDL und in Folgeprojekten zur Konservierung von *M. leprae* DNA und RNA verwendet wurden. Aufgrund des fehlenden diagnostischen Zugewinns der DNA Extraktion aus dem Transportmedium RNA*later*, empfiehlt sich zudem die alleinige, kostengünstigere und schnellere RNA Extraktion, was auch in Folgestudien so umgesetzt wurde.

Durch die Testung zweier Nasenabstriche konnte in dem Transportmedium CLS ein zusätzlicher diagnostischer Gewinn von 20% für die RLEP qPCR und 37,5% für die TTC qPCR erzielt werden. Auch in dem Transportmedium RNA*later* konnte durch die Abnahme von Schleimhautabstrichen aus beiden Nasenlöchern ein diagnostischer Zugewinn von 55,6% für die 16S rRNA RT-qPCR erzielt werden, weshalb die Abnahme von Abstrichen aus beiden Nasenlöchern weiterhin in Folgestudien Anwendung fand.

5.2.4. Negativ getestete Patienten

Durch die qPCR Diagnostik konnten fünf klinisch diagnostizierte MB Lepra-Patienten (5/20; 25%) in keiner der getesteten Proben, weder DNA noch RNA, positiv getestet werden. Die Testung dieser Patientenproben mittels GAPDH qPCR war positiv, womit ein Fehler während der Extraktion ausgeschlossen werden konnte. Eine mögliche Ursache für die negative Testung stellt hingegen der Probentransport oder die Art und Dauer der Lagerung dar. Zur Probenentnahme mussten die geschulten Teams oft längere Strecken auf unbefestigten Straßen zurücklegen, wodurch die Proben möglicherweise nicht immer in aufrechter Position gelagert wurden und somit die Abstrichtupfer nicht kontinuierlich mit den Transportmedien bedeckt waren. Eine weitere Ursache für die *M. leprae* negativ getesteten Patienten könnte die Patientenrekrutierung, basierend auf der klinischen Diagnose Lepraerkrankter, darstellen. Diese Methode ist stark von der subjektiven Erfahrung und Einschätzung des Untersuchers abhängig und schließt nicht sicher aus, dass den vorhandenen Hautläsionen eine andere Ursache zu Grunde liegt.

Außerdem bleibt unklar, welche Rolle verschiedene Umweltfaktoren in der Transmission spielen und über welchen Zeitraum *M. leprae* in den Schleimhäuten vorhanden ist. Eine Studie von Lavania et al. weist darauf hin, dass das Vorkommen von *M. leprae* DNA in Nasenabstrichen von saisonalen Gegebenheiten beeinflusst wird. So konnten bei Kontaktpersonen höhere Positivitätsraten in der RLEP PCR bei höherer Luftfeuchtigkeit und niedrigeren Temperaturen detektiert werden. (65) Und auch Argaw et al. postulieren, dass *M. leprae* häufiger in der geeigneten Mikroumgebung, wie beispielsweise feuchten Böden, vorkommt. (178) In Togo herrscht ganzjährig tropisch-feuchtes Klima. Im Süden gibt es zwei Regenzeiten pro Jahr von April bis Juni und von September bis November, im Norden hingegen dauert die Regenzeit von Mai bis November an. (179) Somit kann eine Beeinflussung der in dieser Arbeit ermittelten Positivitätsraten durch die klimatischen Bedingungen in Togo auch nicht ausgeschlossen werden. Um saisonale und umweltbedingte Einflussfaktoren auf den Trägerstatus von *M. leprae* DNA und RNA (also lebenden Mykobakterien) in der Nasenschleimhaut genauer zu evaluieren, sind weitere longitudinale Studien nötig. Konkret wäre die Durchführung einer prospektiven Kohorten-Studie über mindestens fünf Jahre sinnvoll, um jegliche klimatische Gegebenheiten eines Landes abzudecken. Hierbei sollte zu definierten Zeitpunkten der Trägerstatus von Patienten und Kontaktpersonen untersucht und mit den jeweiligen klimatischen Verhältnissen korreliert werden. Hierdurch könnten außerdem Rückschlüsse gezogen werden, ob und über welchen Zeitraum negative Testungen wiederholt werden sollten.

Von den 15 *M. leprae* DNA positiv getesteten Patienten wurden 10 Patienten auch RNA positiv getestet. Die 5 DNA positiven, aber RNA negativen Patienten wurden mittels GAPDH mRNA qPCR positiv getestet, womit die RNA Extraktion erfolgreich war und keinen Grund für die negative Testung der Proben darstellt. Vielmehr konnte durch Quantifizierung der RLEP Kopienzahl gezeigt werden (wie unter 4.2.4.5. beschrieben), dass diese mit weniger als einem Bakterium (in 2 µl eingesetztem Material) unterhalb der Nachweisgrenze des Viabilitätsassays lagen (LOD von 3 Kopien). Zum Zeitpunkt der Probenentnahme war die Bakterienlast in der Nase dieser Lepra-Patienten also zu gering um RNA nachzuweisen.

Außerdem wurde, zum Ausschluss einer zu langen Lagerung oder einer verzögerten Bearbeitung der klinischen Proben, für den weiteren Studienverlauf ein Lagerungsprotokoll (im Anhang: Abbildung 9. Lagerungsprotokoll) zur Dokumentation der Daten der Probenentnahme, Ankunft am INH, Extraktion und Versand an die AITM erstellt.

5.2.5. Vergleich der RLEP und TTC Kopienzahlen mit anderen Untersuchungen

Die Analyse von *M. leprae* Genomen unterschiedlicher geographischer Herkunft weist eine ungewöhnlich hohe Konkordanz der Nukleotidsequenzen von bis zu 99,9% auf. Dennoch ist es möglich, anhand bestimmter Marker (engl.: „variable number of tandem repeats“, VNTR; engl.: „single nucleotide polymorphisms“, SNP) unterschiedliche *M. leprae* Genotypen und Stämme zu unterscheiden. (18) (129) (180) Eine molekulare Typisierung von *M. leprae* Stämmen kann auch zum besseren Verständnis der Transmissionsquelle und Dynamik der Lepra beitragen. Hierzu werden VNTRs mit einer breiten allelischen Diversität als sinnvolle Instrumente zur Analyse von Transmissionsmustern in einer Gemeinschaft angesehen, (181) (182) während VNTRs und SNPs mit einer geringen allelischen Vielfalt vor allem dazu verwendet werden können, die globale Verteilung der *M. leprae* Genotypen nachzuvollziehen. (183) (184) (185) Daten einer molekularen Typisierung von togoischen *M. leprae* Stämmen sind bis dato noch nicht vorhanden.

Für das lepraspezifische Element RLEP wurden in Studien Kopienzahlen zwischen 19 und 37 in verschiedenen geographischen Gebieten nachgewiesen. (114) (115) In dieser Arbeit ergab die Berechnung der RLEP-Kopienzahl pro togoischem *M. leprae* Genom durchschnittlich $n = 30$, mit einem Maximum von $n = 36$ und Minimum von $n = 25$ RLEP Kopien, wobei die Kopienzahl

nur in Proben verschiedener Patienten variierte, nicht aber innerhalb unterschiedlicher Proben eines Patienten.

Unklar bleibt, ob die RLEP Kopienzahl - neben geographischen Unterschieden - nach stattgefundener Infektion stabil bleibt. (129) Studien über Verhalten und Stabilität der RLEP Wiederholungen vor, während und nach einer Infektion sind zur endgültigen Klärung dieser Fragestellung notwendig.

VNTR Analysen der repetitiven TTC Sequenz innerhalb einer Population variierten zwischen 10-37 Kopien auf den Philippinen (129), 15-20 in Indien (186) und 8-37 Kopien in Thailand. (138) (187) Die Berechnung der TTC Kopienzahl dieser Arbeit ergab pro togoischem *M. leprae* Genom eine Kopie und deckte sich nicht mit den Ergebnissen der genannten Studien. Aufgrund der unter 5.2.1. erläuterten Schwierigkeiten der TTC Amplifizierung aus klinischen Proben muss jedoch davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse nicht die tatsächlich in den Proben vorhandene Anzahl an TTC Wiederholungen darstellen und dieser Wert tatsächlich höher liegt.

5.2.6. Anwendung in der AITM zur Lepradiagnostik in Deutschland

Während meiner Forschungstätigkeit am Tropeninstitut in München von April bis Oktober 2012 konnte bei zwei Patienten, welche mit lepratypischen Hautveränderungen in der Ambulanz vorstellig wurden, mittels der hier beschriebenen Testverfahren *M. leprae* DNA nachgewiesen werden.

Bei einem 43-jährigen männlichen MB Lepra-Patienten pakistanischer Herkunft wurde mittels RLEP qPCR *M. leprae* in Nasenschleimhautabstrichen (Transportmedium CLS) nachgewiesen und durch anschließende DNA Sequenzierung bestätigt. Die TTC qPCR und 16S rRNA RT-qPCR Ergebnisse waren zu diesem Zeitpunkt negativ. Fünf Jahre nach Abschluss einer adäquaten medikamentösen Therapie, wurden die von mir entwickelten Tests zur Diagnostik eines Lepra-Rezidives bei diesem Patienten verwendet.

Bei einer 26-jährigen weiblichen Patientin indischer Herkunft mit klinischen Symptomen einer PB Lepra konnte *M. leprae* in Stanzbiopsien zweier Hautläsionen (im Transportmedium CLS) per RLEP qPCR nachgewiesen werden. Die TTC qPCR und 16S rRNA RT-qPCR waren negativ. In den zum gleichen Zeitpunkt abgenommenen Nasenschleimhautabstrichen konnte durch keines der Testverfahren *M. leprae* DNA oder RNA nachgewiesen werden. Eine deutlich

höhere Bakterienlast in Nasenschleimhaut- und Wangenabstrichen der MB Patienten, verglichen mit PB Patienten, stellt eine mögliche Erklärung dieser Ergebnisse dar. (83) (92) Der Fall wurde von mir im Juli 2012 auf dem Infektionskolloquium der LMU München vorgestellt.

In der AITM wurde die RLEP qPCR und der RNA Viabilitätstest validiert und als fester Bestandteil der diagnostischen Leistungen etabliert. Klinische Proben sowohl aus der Institutsambulanz als auch aus ganz Deutschland werden mittels dieser Tests untersucht und der Viabilitätsassay bereits erfolgreich zum Behandlungsmonitoring nach MDT angewandt.

5.3. Zukünftige Anwendung

Unter tropischen Bedingungen ist zur Durchführung einer qPCR auf folgende Umstände zu achten: Einige Reagenzien müssen für den Transport zum Laboratorium (wie beispielsweise die reverse Transkriptase) auf Trockeneis transportiert werden. Eine technische Ausstattung mit Kühl- und Gefriermöglichkeiten ist zur Lagerung der Reagenzien nötig, gehört in Endemiegebieten jedoch nicht selbstverständlich zur Grundausstattung eines Labors. Ebenso sind teure „Real-Time“ PCR-Geräte in Endemiegebieten nur in Forschungszentren und Referenz-Laboratorien vorhanden (Tabelle 32. Vor- und Nachteile der RLEP qPCR und 16S rRNA RT-qPCR). Zudem muss eine konstante Stromversorgung sichergestellt sein, um ein Auftauen und erneutes Einfrieren der Reagenzien zu verhindern und technische Geräte zuverlässig betreiben zu können. In Togo sind diese erforderlichen Bedingungen gegeben.

Unter Feldbedingungen in Togo zeigte die Testung von Nasenschleimhautabstrichen mittels RLEP qPCR und 16S rRNA RT-qPCR exzellente Ergebnisse. Sie stellen also eine geeignete Diagnosemöglichkeit für weitere Studien bezüglich der *M. leprae* Transmission und prophylaktischen Therapie dar. Studien konnten zeigen, dass eine Einzeldosis Rifampicin die Lepra-Inzidenz in der entsprechenden Bevölkerung und auch bei Kontaktpersonen signifikant über einen Zeitraum von zwei Jahren reduziert. (78) (79) Zur Anwendung der Chemoprophylaxe existieren verschiedene Ansätze: Zum einen die Behandlung aller Kontaktpersonen nach ausdrücklicher Zustimmung des Index-Patienten. (37) (78) (79) (80) (173) Zum anderen wird von der WHO die präventive Behandlung, beispielsweise einer ganzen Dorfgemeinschaft, als sogenannter „blanket approach“ empfohlen, wodurch auch die Stigmatisierung Lepraerkrankter vermieden werden kann. (88) Alternativ bieten die in dieser Arbeit etablierten molekularen Tests die Möglichkeit *M. leprae* Träger ohne klinische

Manifestationen zu identifizieren und deren individuelles Krankheitsrisiko – im Rahmen des Ansatzes unserer Arbeitsgruppe - durch eine prophylaktische Behandlung zu senken.

Da unbehandelte Lepraerkrankte die bedeutendste Infektionsquelle im Übertragungsweg darstellen, bietet der RNA basierte Viabilitätsnachweis und die Quantifizierung der Bakterienlast zudem die Möglichkeit der Identifizierung von Personen mit hohem Potential zur Übertragung der Erkrankung und der Überwachung des individuellen Therapieverlaufs. (67) (68)

Der technischen und klinischen Validierung der Testverfahren und deren Evaluation folgend, wurden die RLEP qPCR und der 16S rRNA RT-qPCR Viabilitätsassay am „Institut National d'Hygiène“ in Lomé, Togo implementiert. Jährlich etwa 100 neue Lepraverdachtsfälle können so in Togo mittels RLEP qPCR aus Nasenschleimhautabstrichen labordiagnostisch getestet und ggf. einer Viabilitätstestung unterzogen werden.

Haushaltskontakte von MB Patienten wurden in einer Folgestudie der Arbeitsgruppe um Prof. Bretzel mittels RLEP qPCR und des RNA Viabilitätstests untersucht.

In Ländern ohne Vorhandensein der notwendigen technischen Laborausstattungen können diese Tests nicht verwendet werden. Die Anwendung der PCR im Rahmen der Lepradiagnostik wird auch in den aktuellen Richtlinien der WHO routinemäßig nicht empfohlen. Dies ist vornehmlich zurückzuführen auf einen Mangel an Standardisierung, kommerziell nicht vorhandenen Tests und den oben beschriebenen technischen Schwierigkeiten bei der Durchführung einer PCR im Rahmen der medizinischen Grundversorgung vieler Länder. (88) (11) Aufgrund der unter 5.1. und 5.2. diskutierten Anwendungsmöglichkeiten der Tests und dem hiermit verbundenen Potential zur Senkung des Transmissionsrisikos, sollten die aktuellen WHO-Richtlinien unbedingt reevaluiert werden.

Eine Möglichkeit den technischen Herausforderungen der PCR Diagnostik zu begegnen, bietet die Weiterentwicklung zu einer Trockenreagenz-qPCR zum DNA und RNA Nachweis. In Studien zum Buruli Ulkus konnte bereits durch Verwendung von Trockenreagenzien die PCR mit Hilfe lyophilisierter, temperaturstabiler Reagenzien erfolgreich an tropische Bedingungen adaptiert werden. (188) (189)

| Vorteile |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - Die Testverfahren sind zu 100% <i>M. leprae</i> spezifisch und hoch sensitiv - Durch Quantifizierung der Bakterienlast können sowohl Rückschlüsse auf das Übertragungsrisiko von Patienten und <i>M. leprae</i> Trägern als auch auf das Erkrankungsrisiko von <i>M. leprae</i> Trägern gezogen werden - Informationen über die Viabilität und Bakterienlast machen eine gezielte und intensivierete Umfelduntersuchung bei potentiellen Hochrisikotransmittern möglich - Gute Anwendbarkeit in Feldstudien, da als Probenmaterial minimal invasive Nasenschleimhautabstriche verwendet werden |
| Nachteile |
| <ul style="list-style-type: none"> - Einzelne Reagenzien müssen auf Trockeneis zum Laboratorium transportiert werden, dies erschwert Anwendbarkeit in Endemiegebieten - Kosten von ca. 20€ pro Test und Vorhandensein einer Real-Time PCR Maschine |

Tabelle 32. Vor- und Nachteile der RLEP qPCR und 16S rRNA RT-qPCR

6. Zusammenfassung

Die Lepra, durch das Bakterium *Mycobacterium leprae* hervorgerufen, ist eine chronische Erkrankung und manifestiert sich vor allem in der Haut und dem peripheren Nervensystem. Die Erkrankung umfasst verschiedene klinische Manifestationen, deren breites Spektrum zwischen der tuberkuloiden Verlaufsform (PB) und der lepromatösen Form (MB) variiert. Trotz guter Fortschritte zur Elimination der Lepra seit Einführung der MDT liegt der Anteil von Grad 2 Behinderungen bei Diagnosestellung weltweit noch bei 5,8% - als Indikator für eine frühe Diagnose und Behandlung - und der Anteil an Kindern unter den Neuerkrankungen bei 8,1%, was auf eine fortlaufende *M. leprae* Transmission hindeutet. Aus diesem Grund stellen neue Ansätze zur frühzeitigen Diagnose und Behandlung von Lepapatienten, aber auch von Kontaktpersonen insbesondere multibazillärer Patienten, wichtige Kernpunkte zur Reduktion der Lepra-Inzidenz dar. In dieser Arbeit, welche im Rahmen des Forschungsprojektes „Molecular Diagnosis of Leprosy“ in Zusammenarbeit zwischen der AIMT, der DAHWT und dem INH in Togo realisiert werden konnte, wurden daher sensitive molekulare Tests inklusive eines Viabilitätsnachweis zur Detektion von *M. leprae* validiert. Nach Evaluation der Ergebnisse konnte die RLEP qPCR zum DNA Nachweis und die 16S rRNA RT-qPCR als Viabilitätsassay erfolgreich im weiteren Studienverlauf etabliert werden. Als Probenmaterial wurden Nasenschleimhautabstriche erstmalig für den RNA Nachweis verwendet, sodass durch nicht invasive und einfache Probenentnahme auch eine Untersuchung von Leprapatienten und Kontaktpersonen potentieller *M. leprae* Träger möglich ist. Zudem wurden verschiedene Transportmedien zur Konservierung von *M. leprae* DNA (CLS, TLS) und RNA (RNA*later*, PANTA) und vier unterschiedliche Extraktionsmethoden evaluiert, wobei die besten qPCR Ergebnisse mit Extrakten der Puffer CLS und RNA*later* erzielt werden konnten, welche daher zur Konservierung von DNA und RNA auch in Folgestudien verwendet wurden. Die neuen Testmethoden zum Nachweis von *M. leprae* DNA bieten die Möglichkeit auch Patienten mit geringer Bakterienlast und klinisch schwer zu diagnostizierende Fälle früh zu detektieren. Auch können Kontaktpersonen untersucht und durch prophylaktisch-therapeutische Interventionen von *M. leprae* Trägern ohne klinische Manifestation, deren individuelles Erkrankungsrisiko gesenkt werden. RNA basierter Viabilitätsnachweis und Quantifizierung der Bakterienlast ermöglichen die Überwachung des individuellen Therapieverlaufs sowie die Identifizierung von Personen mit hohem Potential zur Übertragung der Erkrankung, bei denen therapeutische bzw. prophylaktisch-therapeutische Interventionen einen wichtigen Beitrag zur Unterbrechung der Transmission von *M. leprae* und somit zur Reduktion der Lepra-Inzidenz darstellen.

7. Literaturverzeichnis

1. Scollard D.M., Adams L.B., Gillis T.P., Krahenbuhl J.L., Truman R.W., Williams D.L. *The Continuing Challenges of Leprosy. Clin Microbiology* 19:338-81. 2006.
2. Britton W.J., Lockwood D.N. *Leprosy. Lancet.* 363:1209-19. 2004.
3. Hof H., Rüdiger D. *Medizinische Mikrobiologie. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, Deutschland.* 2009.
4. Frota C.C., Lima L.N., Rocha Ada S., Suffys P.N., Rodrigues L.C., Barreto M.L., Kandall C., Kerr L.R. *Mycobacterium leprae in six-banded (Euphractus sexcinctus) and nine-banded armadillos (Dasypus novemcinctus) in Northeast Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz.* 107 Suppl 1:209-13. 2012.
5. Balamayooran G., Krahenbuhl J.L. *The armadillo as an animal model and reservoir host for Mycobacterium leprae. Clin Dermatol.* 33(1):108-15. 2015.
6. Avanzi C., Del-Pozo J., Benjak A., Stevenson K., Simpson V.R., Busso P., McLuckie J., Loiseau C., Lawton C., Schoening J., Shaw D.J., Piton J., Vera-Cabrera L., Velarde-Felix JS., McDermott F., Gordon S.V., Cole S.T., Meredith A.L. *Red squirrels in the British Isles are infected with leprosy bacilli. Science.* 354(6313):744-7. 2016.
7. Shepard C.C., McRae D.H. *Mycobacterium leprae in Mice: Minimal Infectious Dose, Relationship Between Staining Quality and Infectivity, and Effect of Cortisone. J Bacteriol.* 89(2):365-72. 1965.
8. McRae D.H., Shepard C.C. *Relationship Between the Staining Quality of Mycobacterium leprae and Infectivity for Mice. Infect Immun.* 3(1):116-20. 1971.
9. Shetty V.P., Khambati F.A., Ghate S.D., Capadia G.D., Pai V.V., Ganapati R. *The effect of corticosteroids usage on bacterial killing, clearance and nerve damage in leprosy; part 3-Study of two comparable groups of 100 multibacillary (MB) patients each, treated with MDT + steroids vs. MDT alone, assessed at 6 months post-release from 12 months MDT. Lepr Rev.* 81(1):41-58. 2010.
10. Suzuki K., Udono T., Fujisawa M., Tanigawa K., Idani G., Ishii N. *Infection during infancy and long incubation period of leprosy suggested in a case of a chimpanzee used for medical research. J Clin Microbiol.* 48(9):3432-4. 2010.
11. Scollard D.M., Gillis T.P. *International Textbook of Leprosy.* <https://www.internationaltextbookofleprosy.org>. Aufgerufen am 20.01.2019.
12. Shepard C.C. *Temperature optimum of Mycobacterium leprae in mice. J Bacteriol.* 90:1271-5. 1965.

13. **Lastória J.C., Abreu M.A.** *Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects. An Bras Dermatol.* 89(2):205-18. 2014.
14. **RKI.** Steckbrief seltener und importierter Infektionskrankheiten. http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/Steckbriefe/Steckbriefe_120606.pdf;jsessionid=7E165DEB7226A38C73067ED94FBE88F7.2_cid390?__blob=publicationFile. Aufgerufen am 15.06.2015.
15. **Reibel F., Cambau E., Aubry A.** *Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. Med Mal Infect.* 45(9):383-93. 2015.
16. **Robbins G., Tripathy VM., Misra VN., Mohanty RK., Shinde VS., Gray K. M., Schug M. D.** *Ancient Skeletal Evidence for Leprosy in India (2000 B.C.). PLoS ONE* 4(5):e5669. 2009.
17. **Hulse E.V.** *Leprosy and Ancient Egypt. Lancet.* 2:1024. 1972.
18. **Monot M., Honoré N., Garnier T., Araoz R., Coppée J.Y., Lacroix C., Sow S., Spencer J.S., Truman R.W., Williams D.L., Gelber R., Virmond M., Flageul B., Cho S.N., Ji B., Paniz-Mondolfi A., Convit J., Young S., Fine P.E., Rasolofo V., Brennan P.J., Cole S.T.** *On the Origin of Leprosy. Science.* 308(5724):1040-2. 2005.
19. **Stingl P.** *History of Leprosy - 100th anniversary of Hansen's death. Flug u Reisemed.* 19(2):77-9. 2012.
20. **Gómez-Valero L., Rocha E.P., Latorre A., Silva F.J.** *Reconstructing the ancestor of Mycobacterium leprae: the dynamics of gene loss and genome reduction. Genome Res.* 17(8):1178-85. 2007.
21. **Monot M., Honoré N., Garnier T., Zidane N., Sherafi D., Paniz-Mondolfi A., Matsuoka M., Taylor G.M., Donoghue H.D., Bouwman A., Mays S., Watson C., Lockwood D., Khamesipour A., Dowlati Y., Jianping S., Rea T.H., Vera-Cabrera L., Stefani M.M., Banu S., Macdonald M., Sapkota B.R., Spencer J.S., Thomas J., Harshman K., Singh P., Busso P., Gattiker A., Rougemont J., Brennan P.J., Cole S.T.** *Comparative genomic and phylogeographic analysis of Mycobacterium leprae. Nat Genet.* 41(12):1282-9. 2009.
22. **Ji B.H.** *Drug resistance in leprosy-a review. Lepr Rev.* 56(4):265-78. 1985.
23. **WHO.** *Leprosy. Fact sheet N°101. Geneva, Switzerland.* 2012.
24. **WHO.** *Global leprosy situation. Wkly Epidemiol Rec.* 87, 317-28. 2012.
25. **WHO.** *Global leprosy situation. Wkly Epidemiol Rec.* 83:293-300. 2008.
26. **WHO.** *Global leprosy situation. Wkly Epidemiol Rec.* 84:333-40. 2009.
27. **WHO.** *Global leprosy update: time for action, accountability and inclusion. Wkly Epidemiol Rec.* 91:405–20. 2016.

28. **WHO.** *Global leprosy update 2016: accelerating reduction of disease burden.* *Wkly Epidemiol Rec.* 92:501–20. 2017.
29. **Anonymous.** *World Health Assembly resolution 1991.* <http://www.who.int/lep/strategy/wha/en/index.html>. Aufgerufen am: 14.09.2013.
30. **Rodrigues L., Lockwood D.N.J.** *Leprosy now: epidemiology, progress, challenges and research gaps.* *Lancet Infect Dis.* 11:464-70. 2011.
31. **WHO.** *Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Third WHO report on neglected tropical diseases.* Geneva, Switzerland. 2015.
32. **Saunderson P.R.** *Leprosy Elimination: Not as Straightforward as It Seemed.* *Public Health Rep.* 123(2):213–6. 2008.
33. **Smith W.C., van Brakel W., Gillis T., Saunderson P., Richardus J.H.** *The missing millions: a threat to the elimination of leprosy.* *PLoS Negl Trop Dis.* 9(4):e0003658. 2015.
34. **Lockwood D.N.J., Shetty V., Penna G.O.** *Hazards of setting targets to eliminate disease: lessons from the leprosy elimination campaign.* *BMJ.* 348:g1136. 2014.
35. **WHO.** *Global leprosy situation.* *Wkly Epidemiol Rec.* 93:445–56. 2018.
36. **WHO.** *Global Leprosy Strategy 2016–2020: accelerating towards a leprosy-free world – 2016 operational manual.* Geneva, Switzerland. 2015.
37. **Smith W.C.S., Aerts A.** *Role of contact tracing and prevention strategies in the interruption of leprosy transmission.* *Lerp Rev.* 85:2-17. 2014.
38. **Smith C.S., Noordeen S.K., Richardus J.H., Sansarricq H., Cole S.T., Soares R.C., Savioli L., Aerts A., Barua S.** *A strategy to halt leprosy transmission.* *Lancet Infect Dis.* 14:96-8. 2014.
39. **WHO.** *Bulletin of the World Health Organisation.* 89:487-95. 2011.
40. **Köhler W., Eggers H.J., Fleischer B., Marre R., Pfister H., Pulverer G. (Hrsg.).** *Medizinische Mikrobiologie.* 8. Auflage. Urban und Fischer Verlag. München, Deutschland. 2001.
41. **Darai G., Handermann M., Sonntag H.G., Zöller L. (Hrsg.).** *Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen.* 4. Auflage. Springer. Berlin, Deutschland. 2012.
42. **Bakker M.I., Hatta M., Kwenang A., Faber W.R., van Beer S.M., Klatser P.R., Oskam L.** *Population survey to determine risk factors for Mycobacterium leprae transmission and infection.* *International Journal Of Epidemiology.* 33:1329-36. 2004.
43. **Job C.K., Jayakumar J., Kearney M., Gillis T.P.** *Transmission of Leprosy: A Study of Skin and Nasal Secretions of Household Contacts of Leprosy Patients Using PCR.* *Am J Trop Med Hyg.* 78(3):518-21. 2008.
44. **Visentainer J.E., Tsuneto L.T., Serra M.F., Peixoto P.R., Petzl-Erler M.L.** *Association of leprosy with HLA-DR2 in a Southern Brazilian population.* *Braz J Med Biol Res.* 30(1):51-9. 1997.

45. **Abel L., Sánchez F.O., Oberti J., Thuc N.V., Hoa L.V., Lap V.D., Skamene E., Lagrange P.H., Schurr E.** *Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. J Infect Dis.* 177(1):133-45. 1998.
46. **Ridley D. S.** *Histological classification and the immunological spectrum of leprosy. Bull World Health Organ.* 51(5):451–65. 1974.
47. **Löscher T., Burchard G.D. (Hrsg.).** *Tropenmedizin in Klinik und Praxis: mit Reise- und Migrationsmedizin.* 4. Auflage. Thieme. Stuttgart, Deutschland. 2010.
48. **Suerbaum S., Hahn H., Burchard G.D., Kaufmann H.E., Schulz T.** *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.* 7. Auflage. Springer. Heidelberg, Deutschland. 2012.
49. **Cohen J., Powderly W.G., Opal S.M. (Hrsg.).** *Infectious Diseases. Third edition.* Elsevier. London, UK. 2010.
50. **Suneetha S., Arunthathi S., Chandi S., Kurian N., Chacko C.J.** *Histological studies in primary neuritic leprosy: changes in the apparently normal skin. Lepr Rev.* 69:351–7. 1998.
51. **Van Brakel W.H., de Soldenhoff R., McDougall A.C.** *The allocation of leprosy patients into paucibacillary and multibacillary groups for multidrug therapy, taking into account the number of body areas affected by skin, or skin and nerve lesions. Lepr Rev.* 63:231–46. 1992.
52. **Yamamura M., Wang X.H., Ohmen J.D.** *Cytokine patterns of immunological mediated tissue damage. J Immunol.* 149:1470-5. 1992.
53. **Lockwood D.N.J., Nicholls P., Smith W.C.S., Das L., Barkataki P.** *Comparing the Clinical and Histological Diagnosis of Leprosy and Leprosy Reactions in the INFIR Cohort of Indian Patients with Multibacillary Leprosy. PLoS Negl Trop Dis.* 6(6):e1702. 2012.
54. **Cho S.N., Cellona R.V., Villahermosa L.G., Fajardo T.T. Jr, Balagon M.V., Abalos R.M., Tan E.V., Walsh G.P., Kim J.D., Brennan P.J.** *Detection of phenolic glycolipid I of Mycobacterium leprae in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. Clin Diagn Lab Immunol.* 8(1):138-42. 2001.
55. **Spierings E., De Boer T., Zulianello L., Ottenhof T.H.** *Novel mechanisms in the immunopathogenesis of leprosy nerve damage: the role of Swan cells, T cells and Mycobacterium leprae. Immunol Cell Biol.* 78(4):349-55. 2000.
56. **WHO.** *Expert Committee on Leprosy. Eighth report.* Geneva, Switzerland. 2012.
57. **de Moura R.S., Calado K.L., Oliveira M.L.W., Bühner-Sékula S.** *Leprosy serology using PGL-I: a systematic review. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 41(Suplemento II):11-8. 2008.
58. **Lockwood D.N., Sarno E., Smith W.C.** *Classifying leprosy patients-searching for the perfect solution? Lepr Rev.* 78(4):317-20. 2007.

59. **Parkash O.** *Classification of leprosy into multibacillary and paucibacillary groups: an analysis.* *FEMS Immunol Med Microbiol.* 55(1):1-5. 2009.
60. **Moorthy B.N., Kumar P., Chatura K.R., Chandrasekhar H.R., Basavaraja P.K.** *Histopathological correlation of skin biopsies in leprosy.* *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 67(6):299–301. 2001.
61. **Pardillo F.E., Fajardo T.T., Abalos R.M., Scollard D., Gelber R.H.** *Methods for the classification of leprosy for treatment purposes.* *Clin Infect Dis.* 44(8):1096–9. 2007.
62. **Martinez A.N., Ribeiro-Alves M., Sarno E.N., Moraes M.O.** *Evaluation of qPCR-based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens.* *PLoS Negl Trop Dis.* 5(10):e1354. 2011.
63. **Martinez A.N., Talhari C., Moraes M.O., Talhari S.** *PCR-based techniques for leprosy diagnosis: from the laboratory to the clinic.* *PLoS Negl Trop Dis.* 8(4):e2655. 2014.
64. **Goulart I.M., Bernardes Souza D.O., Marques C.R., Pimenta V.L., Goncalves M.A., Goulart L.R.** *Risk and protective factors for leprosy development determined by epidemiological surveillance of household contacts.* *Clin Vaccine Immunol.* 15:101–5. 2008.
65. **Lavania M., Turankar R.P., Karri S., Chaitanya V.S, Sengupta U., Jadhav R.S.** *Cohort study of the seasonal effect on nasal carriage and the presence of Mycobacterium leprae in an endemic area in the general population.* *Clin Microbiol Infect.* 19:970–4. 2013.
66. **Smith W.C., Smith C.M., Cree I.A., Jadhav R.S., Macdonald M., Edward V.K., Oskam L., van Beers S., Klatser P.** *An approach to understanding the transmission of Mycobacterium leprae using molecular and immunological methods: results from the MILEP2 study.* *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 72(3):269-77. 2004.
67. **Araújo S., Lobato J., Reis Ede M., Souza D.O., Gonçalves M.A., Costa A.V., Goulart L.R., Goulart I.M.** *Unveiling healthy carriers and subclinical infections among household contacts of leprosy patients who play potential roles in the disease chain of transmission.* *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 107 Suppl 1:55-9. 2012.
68. **Klatser P.R., van Beers S., Madjid B., Day R., de Wit M.Y.** *Detection of Mycobacterium leprae nasal carriers in populations for which leprosy is endemic.* *J Clin Microbiol.* 31(11):2947-51. 1993.
69. **Araujo S., Freitas L.O., Goulart L.R., Goulart I.M.** *Molecular Evidence for the Aerial Route of Infection of Mycobacterium leprae and the Role of Asymptomatic Carriers in the Persistence of Leprosy.* *Clin Infect Dis.* 63(11):1412-20. 2016.

70. Goulart I.M., Araujo S., Filho A.B., de Paiva P.H., Goulart L.R. *Asymptomatic leprosy infection among blood donors may predict disease development and suggests a potential mode of transmission. J Clin Microbiol.* 53:3345–8. 2015.
71. Beyene D., Aseffa A., Harboe M., Kidane D., Macdonald M., Klatser P.R., Bjune G.A., Smith W.C. *Nasal carriage of Mycobacterium leprae DNA in healthy individuals in Lega Robi village, Ethiopia. Epidemiol Infect.* 131(2):841-8. 2003.
72. Lima L.N., Frota C.C., Mota R.M., Almeida R.L., Pontes M.A., Gonçalves Hde S., Rodrigues L.C., Kendall C., Kerr L. *Widespread nasal carriage of Mycobacterium leprae among a healthy population in a hyperendemic region of northeastern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz.* 110(7):898-905. 2015.
73. Banerjee S., Sarkar K., Gupta S., Mahapatra P.S., Gupta S., Guha S., Bandhopadhyay D., Ghosal C., Paine S.K., Dutta R.N., Biswas N., Bhattacharya B. *Multiplex PCR technique could be an alternative approach for early detection of leprosy among close contacts-a pilot study from India. BMC Infect Dis.* 10:252. 2010.
74. Moet F.J., Meima A., Oskam L., Richardus J.H. *Risk factors for the development of clinical leprosy among contacts, and their relevance for targeted interventions. Lepr Rev.* 75(4):310-26. 2004.
75. Brito e Cabral P., Júnior J.E., de Macedo A.C., Alves A.R., Gonçalves T.B., Brito e Cabral T.C., Gondim A.P., Pinto M.I., Oseki K.T., Camara L.M., Rabenhorst S.H., Nagao-Dias A.T. *Anti-PGL1 salivary IgA/IgM, serum IgG/IgM, and nasal Mycobacterium leprae DNA in individuals with household contact with leprosy. Int J Infect Dis.* 17(11):e1005-10. 2013.
76. Douglas J.T., Cellona R.V., Fajardo T.T. Jr, Abalos R.M., Balagon M.V., Klatser P.R. *Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts. Clin Diagn Lab Immunol.* 11(5):897-900. 2004.
77. Bazan-Furini R., Motta A.C., Simão J.C., Tarquínio D.C., Marques W. Jr, Barbosa M.H., Foss N.T. *Early detection of leprosy by examination of household contacts, determination of serum anti-PGL-1 antibodies and consanguinity. Mem Inst Oswaldo Cruz.* 106(5):536-40. 2011.
78. Bakker M.I., Hatta M., Kwenang A., Van Benthem B.H., Van Beers S.M., Klatser P.R., Oskam L. *Prevention of leprosy using rifampicin as chemoprophylaxis. Am J Trop Med Hyg.* 72(4):443-8. 2005.
79. Moet F.J., Pahan D., Oskam L., Richardus J.H. *For the COLEP Study Group. Effectiveness of single dose rifampicin in preventing leprosy in close contacts of patients with newly diagnosed leprosy: cluster randomised controlled trial. BMJ.* 336:761–4. 2008.

80. Fischer E.A., de Vlas S.J., Habbema J.D., Richardus J.H. *The Long Term Effect of Current and New Interventions on the New Case Detection of Leprosy: A Modeling Study.* *PLoS Negl Trop Dis.* 5(9):e1330. 2011.
81. Sales A.M., Ponce de Leon A., Düppre N.C., Hacker M.A., Nery J.A., Sarno E.N., Penna M.L. *Leprosy among Patient Contacts: A Multilevel Study of Risk Factors.* *PLoS Negl Trop Dis.* 5(3):e1013. 2011.
82. Düppre N.C., Camacho L.A., Sales A.M., Illarramendi X., Nery J.A., Sampaio E.P., Sarno E.N., Bühner-Sékula S. *Impact of PGL-I seropositivity on the protective effect of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study.* *PLoS Negl Trop Dis.* 6(6):e1711. 2012.
83. Martins M.V., Guimarães M.M., Spencer J.S., Hacker M.A., Costa L.S., Carvalho F.M., Geluk A., van der Ploeg-van Schip J.J., Pontes M.A., Gonçalves H.S., de Moraes J.P., Bandeira T.J., Pessolani M.C., Brennan P.J., Pereira G.M. *Pathogen-Specific Epitopes as Epidemiological Tools for Defining the Magnitude of Mycobacterium leprae Transmission in Areas Endemic for Leprosy.* *PLoS Negl Trop Dis.* 6(4):e1616. 2012.
84. Geluk A. *Challenges in immunodiagnostic tests for leprosy.* *Expert Opin Med Diagn.* 7(3):265-74. 2013.
85. Geluk A., van der Ploeg-van Schip J.J., van Meijgaarden K.E., Commandeur S., Drijfhout J.W., Benckhuijsen W.E., Franken K.L., Naafs B., Ottenhoff T.H. *Enhancing Sensitivity of Detection of Immune Responses to Mycobacterium leprae Peptides in Whole-Blood Assays.* *Clin Vaccine Immunol.* 17(6):993-1004. 2010.
86. Godal T., Negassi K. *Subclinical infection in leprosy.* *Br Med J.* 3(5880):557-9. 1973.
87. Baumgart K.W., Britton W.J., Mullins R.J., Basten A., Barnetson R.S. *Subclinical infection with Mycobacterium leprae-a problem for leprosy control strategies.* *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 87(4):412-5. 1993.
88. WHO. *Guidelines for the diagnosis, treatment and prevention of leprosy.* Geneva, Switzerland. 2018.
89. Hänscheid T. *The future looks bright: low-cost fluorescent microscopes for detection of Mycobacterium tuberculosis and Coccidia.* *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 102(6):520-1. 2008.
90. Kaufmann S.H.E., Hahn H., Ulrichs T., Bange F.C. (Hrsg.). *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.* 6. Auflage. Springer. Heidelberg, Deutschland. 2009.
91. Genzwürker H., Hinkelbein J., Keil J., Zimmer G. (Hrsg.). *Allex- Alles fürs Examen. Band C,* 2. Auflage. Tieme. Stuttgart, Deutschland. 2014.
92. da Conceição Oliveira Coelho Fabri A., Carvalho A.P., Araujo S., Goulart L.R., de Mattos A.M., Teixeira H.C., Goulart I.M., Duthie M.S., Correa-Oliveira R., Lana F.C. *Antigen-specific*

assessment of the immunological status of various groups in a leprosy endemic region. BMC Infect Dis. 15:218. 2015.

93. **Moura R.S., Penna G.O., Cardoso L.P., de Andrade Pontes M.A., Cruz R., de Sá Gonçalves H., Fernandes Penna M.L., de Araújo Stefani M.M., Bühner-Sékula S.** *Description of leprosy classification at baseline among patients enrolled at the uniform multidrug therapy clinical trial for leprosy patients in Brazil. Am J Trop Med Hyg.* 92(6):1280-4. 2015.

94. **Roche P.W., Britton W.J., Failbus S.S., Williams D., Pradhan H.M., Theuvenet W.J.** *Operational value of serological measurements in multibacillary leprosy patients: clinical and bacteriological correlates of antibody responses. Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 58(3):480-90. 1990.

95. **Spencer J.S, Brennan P.J.** *The role of Mycobacterium leprae phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. Lepr Rev.* 82(4):344-57. 2011.

96. **Oskam L., Slim E., Bühner-Sékula S.** *Serology: recent developments, strengths, limitations and prospects: a state of the art overview. Lepr Rev.* 74(3):196-205. 2003.

97. **Martinez A.N., Britto C.F., Nery J.A., Sampaio E.P., Jardim M.R., Sarno E.N., Moraes M.O.** *Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of Mycobacterium leprae DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. J Clin Microbiol.* 44(9):3154-9. 2006.

98. **Tatipally S., Srikantam A., Kasetty S.** *Polymerase Chain Reaction (PCR) as a Potential Point of Care Laboratory Test for Leprosy Diagnosis-A Systematic Review. Trop Med Infect Dis.* 3(4):107. 2018.

99. **Santos A.R., Balassiano V., Oliveira M.L., Pereira M.A., Santos P.B., Degraeve W.M., Suffys P.N.** *Detection of Mycobacterium leprae DNA by polymerase chain reaction in the blood of individuals, eight years after completion of anti-leprosy therapy. Mem Inst Oswaldo Cruz.* 96(8):1129-33. 2001.

100. **Gama R.S., Gomides T.A.R., Gama C.F.M. Moreira,S.J.M., de Neves Manta F.S., de Oliveira L.B.P., Marcal P.H.F., Sarno E.N., Moraes M.O., Garcia R.M.G.** *High frequency of M. leprae DNA detection in asymptomatic household contacts. BMC Infect. Dis.* 18:153. 2018.

101. **Kang T.J., Kim S.K., Lee S.B., Chae G.T., Kim J.P.** *Comparison of two different PCR amplification products (the 18-kDa protein gene vs. RLEP repetitive sequence) in the diagnosis of Mycobacterium leprae. Clin Exp Dermatol.* 28(4):420-4. 2003.

102. **de Wit M.Y., Faber W.R., Krieg S.R., Douglas J.T., Lucas S.B., Montreewasuwat N., Pattyn S.R., Hussain R., Ponnighaus J.M., Hartskeerl R.A.** *Application of a polymerase chain*

reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues. *J Clin Microbiol.* 29(5):906-10. 1991.

103. **Azevedo M.C., Ramuno N.M., Fachin L.R., Tassa M., Rosa P.S., Belone A.F., Diório S.M., Soares C.T., Garlet G.P., Trombone P.** *qPCR detection of Mycobacterium leprae in biopsies and slit skin smear of different leprosy clinical forms.* *Braz J Infect Dis.* 21(1):71-8. 2017.

104. **Chaitanya V.S., Cuello L., Das M., Sudharsan A., Ganesan P., Kanmani K., Rajan L., Ebenezer M.** *Analysis of a novel multiplex polymerase chain reaction assay as a sensitive tool for the diagnosis of indeterminate and tuberculoid forms of leprosy.* *Int J Mycobacteriol.* 6(1):1-8. 2017.

105. **Yoon K.H., Cho S.N., Lee M.K., Abalos R.M., Cellona R.V., Fajardo T.T. Jr, Guido L.S., Dela Cruz E.C., Walsh G.P., Kim J.D.** *Evaluation of polymerase chain reaction amplification of Mycobacterium leprae-specific repetitive sequence in biopsy specimens from leprosy patients.* *J Clin Microbiol.* 31(4):895-9. 1993.

106. **Goulart I.M., Cardoso A.M., Santos M.S., Goncalves M.A., Pereira J.E., Goulart L.R.** *Detection of Mycobacterium leprae DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size.* *Arch. Dermatol. Res.* 299:267–71. 2007.

107. **Phetsuksiri B., Rudeeaneksin J., Supapakul P., Wachapong S., Mahotarn K., Brennan P.J.** *A simplified reverse transcriptase PCR for rapid detection of Mycobacterium leprae in skin specimens.* *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 48:319–28. 2006.

108. **Tiwari V., Malhotra K., Khan K., Maurya P.K., Singh A.K., Thacker A.K., Husain N., Kulshreshtha D.** *Evaluation of polymerase chain reaction in nerve biopsy specimens of patients with Hansen's disease.* *J. Neurol. Sci.* 380:187–90. 2017.

109. **Fiallo P., Williams D.L., Chan G.P., Gillis T.P.** *Effects of fixation on polymerase chain reaction detection of Mycobacterium leprae.* *J Clin Microbiol.* 30(12):3095-8. 1992.

110. **Banerjee S., Ray D., Bandyopadhyay D., Gupta S., Gupta S., Ghosal C., Biswas N., Bhattacharya S., Dutta R.N., Bhattacharya B.** *Development and application of a new efficient and sensitive multiplex polymerase chain reaction (PCR) in diagnosis of leprosy.* *J Indian Med Assoc.* 106(7):436-40. 2008.

111. **Rudeeaneksin J., Srisungngam S., Sawanpanyalert P., Sittiwakin T., Likanonsakul S., Pasadorn S., Palittapongarnpim P., Brennan P.J., Phetsuksiri B.** *LightCycler real-time PCR for rapid detection and quantitation of Mycobacterium leprae in skin specimens.* *FEMS Immunol Med Microbiol.* 54(2):263-70. 2008.

112. **Kampirapap K., Singtham N., Klatser P.R., Wiriawipart S.** *DNA amplification for detection of leprosy and assessment of efficacy of leprosy chemotherapy. Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 66:16–21. 1998.
113. **Caleffi K.R., Hirata R.D., Hirata M.H., Caleffi E.R., Siqueira V.L., Cardoso R.F.** *Use of the polymerase chain reaction to detect Mycobacterium leprae in urine. Braz. J. Med. Biol. Res.* 45:153–7. 2012.
114. **Truman R.W., Andrews P.K., Robbins N.Y., Adams L.B., Krahenbuhl J.L., Gillis T.P.** *Enumeration of Mycobacterium leprae using real-time PCR. PLoS Negl Trop Dis.* 2(11):e328. 2008.
115. **Woods S.A., Cole S.T.** *A family of dispersed repeats in Mycobacterium leprae. Mol Microbiol.* 4(10):1745-51. 1990.
116. **Fsihi H., Cole S.T.** *The Mycobacterium leprae genome: systematic sequence analysis identifies key catabolic enzymes, ATP-dependent transport systems and a novel polA locus associated with genomic variability. Mol Microbiol.* 16(5):909-19. 1995.
117. **Yan W., Xing Y., Yuan L.C., De Yang R., Tan F.Y., Zhang Y., Li H.Y.** *Application of RLEP real-time PCR for detection of M. leprae DNA in paraffin-embedded skin biopsy specimens for diagnosis of paucibacillary leprosy. Am. J. Trop. Med. Hyg.* 90:524–9. 2014.
118. **Hartskeerl R. A., de Wit M. Y., Klatser P. R.** *Polymerase chain reaction for the detection of Mycobacterium leprae. J. Gen. Microbiol.* 135:2357–64. 1989.
119. **Williams D. L., Gillis T. P., Booth R. J., Looker D., Watson J.D.** *The use of a specific DNA probe and polymerase chain reaction for the detection of Mycobacterium leprae. J. Infect. Dis.* 162:193–200. 1990.
120. **Hackel C., Houard S., Portaels F., van Elsen A., Herzog A., Bollen A.** *Specific identification of Mycobacterium leprae by the polymerase chain reaction. Mol Cell Probes.* 4(3):205-10. 1990.
121. **Plikaytis B.B., Gelber R.H., Shinnick T.M.** *Rapid and sensitive detection of Mycobacterium leprae using a nested-primer gene amplification assay. J Clin Microbiol.* 28(9):1913-7. 1990.
122. **Pattyn S.R., Ursi D., Ieven M., Raes V., Jamet P.** *Polymerase chain reaction amplifying DNA coding for species-specific rRNA of Mycobacterium leprae. Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 60(2):234-43. 1992.
123. **Richter E., Duchrow M., Schlüter C., Hahn M., Flad H.D., Gerdes J.** *Detection of Mycobacterium leprae by three-primer PCR. Immunobiology.* 191(4-5):351-3. 1994.

124. **Wichitwechkarn J., Karnjan S., Shuntawuttisetee S., Sornprasit C., Kampirapap K., Peerapakorn S.** *Detection of Mycobacterium leprae infection by PCR.* *J. Clin. Microbiol.* 33:45–9. 1995.
125. **de Wit M.Y., Douglas J.T., McFadden J., Klatser P.R.** *Polymerase chain reaction for detection of Mycobacterium leprae in nasal swab specimens.* *J Clin Microbiol.* 31(3):502-6. 1993.
126. **Kramme S., Bretzel G., Panning M., Kawuma J., Drosten C.** *Detection and quantification of Mycobacterium leprae in tissue samples by real-time PCR.* *Med Microbiol Immunol.* 193(4):189-93. 2004.
127. **Martinez A.N., Lahiri R., Pittman T.L., Scollard D., Truman R., Moraes M.O., Williams D.L.** *Molecular determination of Mycobacterium leprae viability by use of real-time PCR.* *J Clin Microbiol.* 47(7):2124-30. 2009.
128. **Siwakoti S., Rai K., Bhattarai N.R., Agarwal S., Khanal B.** *Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) with slit skin smear examination (SSS) to confirm clinical diagnosis of leprosy in Eastern Nepal.* *PLoS Negl Trop Dis.* 10(12):e0005220. 2016.
129. **Shin Y.C., Lee H., Lee H., Walsh G.P., Kim J.D., Cho S.N.** *Variable numbers of TTC repeats in Mycobacterium leprae DNA from leprosy patients and use in strain differentiation.* *J Clin Microbiol.* 38(12):4535-8. 2000.
130. **Yoon K.H., Cho S.N., Lee M.K., Abalos R.M., Cellona R.V., Fajardo T.T., Guido L.S., Dela Cruz E.C., Walsh G.P., Kim J.D.** *Evaluation of polymerase chain reaction amplification of Mycobacterium leprae-specific repetitive sequence in biopsy specimens from leprosy patients.* *J Clin Microbiol.* 31(4):895-9. 1993.
131. **Reja A.H., Biswas N., Biswas S., Dasgupta S., Chowdhury I.H., Banerjee S., Chakraborty T., Dutta P.K., Bhattacharya B.** *Fite-Faraco staining in combination with multiplex polymerase chain reaction: A new approach to leprosy diagnosis.* *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 79:693–700. 2013.
132. **Kurabachew M., Wondimu A., Ryon J.J.** *Reverse transcription-PCR detection of Mycobacterium leprae in clinical specimens.* *J Clin Microbiol.* 36(5):1352-6. 1998.
133. **Haile Y., Ryon J.J.** *Colorimetric microtitre plate hybridization assay for the detection of Mycobacterium leprae 16S rRNA in clinical specimens.* *Lepr Rev.* 75(1):40-9. 2004.
134. **Bang P.D., Suzuki K., Phuong le T., Chu T.M., Ishii N., Khang, T.H.** *Evaluation of polymerase chain reaction-based detection of Mycobacterium leprae for the diagnosis of leprosy.* *J. Dermatol.* 36:269–76. 2009.

135. **Maltempe F.G., Baldin V.P., Lopes M.A., Siqueira V.L.D., de Lima Scodro R.B., Cardoso R.F., Caleffi-Ferracioli K.R.** *Critical analysis: Use of polymerase chain reaction to diagnose leprosy. Braz. J. Pharm. Sci.* 52. 2016.
136. **Zhang L., Budiawan T., Matsuoka M.** *Diversity of potential short tandem repeats in Mycobacterium leprae and application for molecular typing. J Clin Microbiol.* 43(10):5221-9. 2005.
137. **Cole S.T., Supply P., Honoré N.** *Repetitive sequences in Mycobacterium leprae and their impact on genome plasticity. Lepr Rev.* 72(4):449-61. 2001.
138. **Srisungngam S., Rudeeaneksin J., Wattanpokayakit S., Pasadorn S., Tragoolpua R., Suwanrit S., Sawanpanyalert P., Phetsuksiri B.** *Typing of Thai clinical isolates of Mycobacterium leprae and analysis of leprosy transmission by polymorphism of tandem repeats. Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 38(4):714-20. 2007.
139. **Harris D.C.** *Lehrbuch der Quantitativen Analyse. 8. Auflage. Springer. Heidelberg, Deutschland.* 2014.
140. **Weigel K.M., Jones K.L., Do J.S., Melton Witt J., Chung J.H., Valcke C., Cangelosi G.A.** *Molecular viability testing of bacterial pathogens from a complex human sample matrix. PLoS One.* 8(1):e54886. 2013.
141. **Garcia M.J., Nuñez M.C., Cox R.A.** *Measurement of the rates of synthesis of three components of ribosomes of Mycobacterium fortuitum: a theoretical approach to qRT-PCR experimentation. PLoS One.* 5(7):e11575. 2010.
142. **Beissner M., Symank D., Phillips R.O., Amoako Y.A., Awua-Boateng N.Y., Sarfo F.S., Jansson M., Huber K.L., Herbinger K.H., Battke F., Löscher T., Adjei O., Bretzel G.** *Detection of viable Mycobacterium ulcerans in clinical samples by a novel combined 16S rRNA reverse transcriptase/IS2404 real-time qPCR assay. PLoS Negl Trop Dis.* 6(8):e1756. 2012.
143. **Desjardin L.E., Perkins M.D., Wolski K., Haun S., Teixeira L.** *Measurement of sputum Mycobacterium tuberculosis messenger RNA as a surrogate for response to chemotherapy. Am J Respir Crit Care Med.* 160:203-10. 1999.
144. **Sarpong-Duah M., Frimpong M., Beissner M., Saar M., Laing K., Sarpong F., Loglo A. D., Abass K. M., Frempong M., Sarfo F. S., Bretzel G., Wansbrough-Jones M., Phillips R. O.** *Clearance of viable Mycobacterium ulcerans from Buruli ulcer lesions during antibiotic treatment as determined by combined 16S rRNA reverse transcriptase /IS 2404 qPCR assay. PLoS Negl Trop Dis.* 11(7):e0005695. 2017.

145. **Smith C.M., Smith W.C.** *Chemoprophylaxis is effective in the prevention of leprosy in endemic countries: a systematic review and meta-analysis.* MILEP2 Study Group. *Mucosal Immunology of Leprosy. J Infect.* 41:137-42. 2000.
146. **Lockwood D.N.J., Krishnamurthy P., Pannikar V., Penna G.** *Letter to the editor: Reply to the role of contact tracing and prevention strategies in the interruption of leprosy transmission.* *Lepr Rev* 86. 124-5. 2015.
147. **Pönnighaus J.M., Fine P.E., Sterne J.A., Wilson R.J., Msosa E., Gruer P.J., Jenkins P.A., Lucas S.B., Liomba N.G., Bliss L.** *Efficacy of BCG vaccine against leprosy and tuberculosis in northern Malawi.* *Lancet.* 339(8794):636-9. 1992.
148. **Zodpey S.P.** *Protective effect of bacillus Calmette Guerin (BCG) vaccine in the prevention of leprosy: a meta-analysis.* *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 73(2):86-93. 2007.
149. **Zodpey S.P., Ambadekar N.N., Thakur A.** *Effectiveness of Bacillus Calmette Guérin (BCG) vaccination in the prevention of leprosy: a population-based case-control study in Yavatmal District, India.* *Public Health.* 119(3):209–16. 2005.
150. **Rodrigues L.C., Kerr-Pontes L.R., Frietas M.V., Barreto M.L.** *Long lasting BCG protection against leprosy.* *Vaccine.* 25(39–40):6842–4. 2007.
151. **Zodpey S.P., Bansod B.S., Shrikhande S.N., Maldhure B.R., Kulkarni S.W.** *Protective effect of Bacillus Calmette Guérin (BCG) against leprosy: a population-based case-control study in Nagpur, India.* *Lepr Rev.* 70(3):287–94. 1999.
152. **Setia M.S., Steinmaus C., Ho C.S., Rutherford G.W.** *The role of BCG in prevention of leprosy: a meta-analysis.* *Lancet Infect Dis.* 6(3):162–70. 2006.
153. **Merle C.S., Cunha S.S., Rodrigues L.C.** *BCG vaccination and leprosy protection: review of current evidence and status of BCG in leprosy control.* *Expert Rev Vaccines.* 9(2):209–22. 2010.
154. **Behr M.A., Wilson M.A., Gill W.P., Salamon H., Schoolnik G.K., Rane S., Small P.M.** *Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray.* *Science.* 284(5419):1520–3. 1999.
155. **WHO.** *Leprosy Today.* <http://www.who.int/lep/en>. Aufgerufen am 21.04.2015.
156. **ILEP.** *Achieving a world free from leprosy. ILEP strategy 2016 - 2018.* 2016.
157. **Moura M.L., Dupnik K.M., Sampaio G.A., Nóbrega P.F., Jeronimo A.K., do Nascimento-Filho J.M.** *Active surveillance of Hansen's Disease (leprosy): importance of case finding among extra-domiciliary contacts.* *PLoS Negl Trop Dis.* 7(3):e2093. 2013.
158. **Richardus R.A., Alam K., Pahan D., Feenstra S.G., Geluk A., Richardus J.H.** *The combined effect of chemoprophylaxis with single dose rifampicin and immunoprophylaxis with BCG to*

prevent leprosy in contacts of newly diagnosed leprosy cases: a cluster randomized controlled trial (MALTALEP study). BMC Infect Dis. 13:456. 2013.

159. **Sarno E.N., Duppre N.C., Sales A.M., Hacker M.A., Nery J.A., de Matos H.J.** *Leprosy exposure, infection and disease: a 25-year surveillance study of leprosy patient contacts. Mem Inst Oswaldo Cruz. 107(8):1054-9. 2012.*

160. **Holling H., Schmitz B.** *Handbuch Statistik, Methoden und Evaluation. 1. Auflage. Hogrefe. Göttingen, Deutschland. 2010.*

161. **Logan J.M.J., Edwards K.J., Saunders N.A.** *Real-time PCR: Current Technology and Applications. Horizon Scientific Press. Norfolk, UK. 2009.*

162. **Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T.** *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 55(4):611-22. 2009.*

163. **Mullis K.B, Faloona F.A.** *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 155:335-50. 1987.*

164. **Rassow J., Hauser K., Netzker R., Deutzmann R.** *Biochemie. 2. Auflage. Thieme. Stuttgart, Detuschland. 2008.*

165. **Anonymous.** https://www.carlroth.com/downloads/ba/de/2/BA_2929_DE.pdf.
Aufgerufen am 15.05.2019.

166. **Burki T.** *Old problems still mar fight against ancient disease. Lancet. 373(9660):287-8. 2009.*

167. **Barber R.D., Harmer D.W., Coleman R.A., Clark B.J.** *GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. Physiol Genomics. 21(3):389-95. 2005.*

168. **Ling D., Salvaterra P.M.** *Robust RT-qPCR data normalization: validation and selection of internal reference genes during post-experimental data analysis. PLoS One. 6(3):e17762. 2011.*

169. **Bär M., Bär D., Lehmann B.** *Selection and validation of candidate housekeeping genes for studies of human keratinocytes-review and recommendations. J Invest Dermatol. 129(3):535-7. 2009.*

170. **Janssens N., Janicot M., Perera T., Bakker A.** *Housekeeping genes as internal standards in cancer research. Mol Diagn. 8(2):107-13. 2004.*

171. **Bonnet-Duquennoy M., Abaibou H., Tailhardat M., Lazou K., Bosset S., Le Varlet B., Cleuziat P., Kurfürst R.** *Study of housekeeping gene expression in human keratinocytes using OLISA, a long-oligonucleotide microarray and q RT-PCR. Eur J Dermatol. 16(2):136-40. 2006.*

172. **Bender R., Lange S.** *Was ist der p-Wert? Artikel Nr. 7 der Statistik-Serie in der DMW. Dtsch Med Wochenschr.* 132:e15–6. 2007.
173. **Richardus J.H., Geluk A.** *Development of a new contact centred strategy to reduce leprosy transmission.* London: International Federation of Anti-Leprosy Associations. London, UK. 2013.
174. **WHO.** *Enhanced Global Strategy for Further Reducing the Disease Burden Due to Leprosy (2011-2015). Operational Guidelines.* Geneva, Switzerland. 2009.
175. **Beissner, M., Huber, K. L., Badziklou, K., Halatoko, W. A., Maman, I., Vogel, F., Bidjada B., Awoussi K. S., Piten E., Helfrich K., Mengele C., Nitschke J., Amekuse K., Wiedemann F. X., Diefenhardt A., Kobara B., Herbinger K.H., Kere A. B., Prince-David M., Löscher T., Bretzel G.** *Implementation of a National Reference Laboratory for Buruli Ulcer Disease in Togo. PLoS Negl Trop Dis.* 7(1):e2011. 2013.
176. **Huggett J.F., Foy C.A., Benes V., Emslie K., Garson J.A., Haynes R., Hellemans J., Kubista M., Mueller R.D., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T., Bustin S.A.** *The digital MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. Clin Chem.* 59(6):892-902. 2013.
177. **Lini N., Shankernarayan N.P., Dharmalingam K.** *Quantitative real-time PCR analysis of Mycobacterium leprae DNA and mRNA in human biopsy material from leprosy and reactional cases. J Med Microbiol.* 58(Pt 6):753-9. 2009.
178. **Tadesse Argaw A., Shannon E.J., Assefa A., Mikru F.S., Mariam B.K., Malone J.B.** *A geospatial risk assessment model for leprosy in Ethiopia based on environmental thermal-hydrological regime analysis. Geospat Health.* 1(1):105-13. 2006.
179. **UNDP.** <https://www.adaptation-undp.org/explore/western-africa/togo>. Aufgerufen am 12.02.2019.
180. **Matsuoka M., Maeda S., Kai M., Nakata N., Chae G.T., Gillis T.P., Kobayashi K., Izumi S., Kashiwabara Y.** *Mycobacterium leprae typing by genomic diversity and global distribution of genotypes. Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 68(2):121-8. 2000.
181. **Matsuoka M., Zhang L., Budiawan T., Saeki K., Izumi S.** *Genotyping of Mycobacterium leprae on the basis of the polymorphism of TTC repeats for analysis of leprosy transmission. J Clin Microbiol.* 42(2):741-5. 2004.
182. **Weng X., Wang Z., Liu J., Kimura M., Black W.C. 4th, Brennan P.J., Li H., Vissa V.D.** *Identification and distribution of Mycobacterium leprae genotypes in a region of high leprosy prevalence in China: a 3-year molecular epidemiological study. J Clin Microbiol.* 45(6):1728-34. 2007.

183. **Matsuoka M., Roa R.I., Budiawan T., Kyaw K., Chae G.T.** *Genotypic analysis of Mycobacterium leprae isolates from Japan and other Asian countries reveals a global transmission pattern of leprosy.* *FEMS Microbiol Lett.* 261(1):150-4. 2006.
184. **Mendum T.A., Schuenemann V.J., Roffey S., Taylor G.M., Wu H., Singh P., Tucker K., Hinds J., Cole S.T., Kierzek A.M., Nieselt K., Krause J., Stewart G.R.** *Mycobacterium leprae genomes from a British medieval leprosy hospital: towards understanding an ancient epidemic.* *BMC Genomics.* 15:270. 2014.
185. **Chae G.T., Lee S.B., Kang T.J., Shin H.K., Kim J.P., Ko Y.H., Kim S.H., Kim N.H.** *Typing of clinical isolates of Mycobacterium leprae and their distribution in Korea.* *Lepr Rev.* 73(1):41-6. 2002.
186. **Lavania M., Katoch K., Sharma R., Sharma P., Das R., Gupta A.K., Chauhan D.S., Katoch V.M.** *Molecular typing of Mycobacterium leprae strains from northern India using short tandem repeats.* *Indian J Med Res.* 133:618-26. 2011.
187. **Phetsuksiri B., Srisungngam S., Rudeeaneksin J., Bunchoo S., Lukebua A., Wongtrungkapun R., Paitoon S., Sakamuri R.M., Brennan P.J., Vissa V.** *SNP genotypes of Mycobacterium leprae isolates in Thailand and their combination with rpoT and TTC genotyping for analysis of leprosy distribution and transmission.* *Jpn J Infect Dis.* 65(1):52-6. 2012.
188. **Siegmund V., Adjei O., Racz P., Berberich C., Klutse E., van Vloten F., Kruppa T., Fleischer B., Bretzel G.** *Dry-reagent-based PCR as a novel tool for laboratory confirmation of clinically diagnosed Mycobacterium ulcerans-associated disease in areas in the tropics where M. ulcerans is endemic.* *J Clin Microbiol.* 43(1):271-6. 2005.
189. **Babonneau J., Bernard C., Marion E., Chauty A., Kempf M., Robert R., Marsollier L., Franco-Beninese Buruli Research Group.** *Development of a Dry-Reagent-Based qPCR to Facilitate the Diagnosis of Mycobacterium ulcerans Infection in Endemic Countries.* *PLoS Negl Trop Dis.* 9(4):e0003606. 2015.
190. **Eichelmann K., González González S.E., Salas-Alanis J.C., Ocampo-Candiani J.** *Leprosy. An update: definition, pathogenesis, classification, diagnosis and treatment.* *Actas Dermosifiliogr.* 104(7):554-63. 2013.
191. **Alberts C.J., Smith W.C., Weima A., Weng L., Richardus J.H.** *Potential effect of the World Health Organization's 2011–2015 global leprosy strategy on the prevalence of grade 2 disability: a trend analysis.* *Bull World Health Organ.* 89(7):487-95. 2011.

192. **de Matos H.J., Duppre N., Alvim M.F., MachadoVieira L.M., Sarno E.N., Struchiner C.J.** *Leprosy epidemiology in a cohort of household contacts in Rio de Janeiro (1987-1991).* *Cad Saude Publica.* 15(3):533-42. 1999.
193. **Hahn H., Kaufmann S.H.E., Schulz T.F., Suerbaum S. (Hrsg.).** *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.* 6. Auflage. Springer. Heidelberg, Deutschland. 2009.
194. **Lockwood D.N.** *Leprosy elimination-a virtual phenomenon or a reality?* *BMJ.* 324(7352):1516-8. 2002.
195. **Martinez T.S., Figueira M.M., Costa A.V., Gonçalves M.A., Goulart L.R., Goulart I.M.** *Oral mucosa as a source of Mycobacterium leprae infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status.* *Clin Microbiol Infect.* 17(11):1653-8. 2010.
196. **Martins A., Miranda A., de Oliveira M., Bühner-Sékula S., Martinez A.** *Nasal mucosa study of leprosy contacts with positive serology for the phenolic glycolipid 1 antigen.* *Braz J Otorhinolaryngol.* 76(5):579-87. 2010.
197. **Sekar B.** *Recent advances in immunodiagnosis of leprosy.* *Indian J Lepr.* 79(2-3):85-106. 2007.
198. **Sikand K., Singh J., Ebron J.S., Shukla G.C.** *Housekeeping gene selection advisory: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and β -actin are targets of miR-644a.* *PLoS One.* 7(10):e47510. 2012.
199. **Sun W., Jin Y., He L., Lu W.C., Li M.** *Suitable reference gene selection for different strains and developmental stages of the carmine spider mite, Tetranychus cinnabarinus, using quantitative real-time PCR.* *J Insect Sci.* 10:208. 2010.
200. **Truman R.W., Krahenbuhl J.L.** *Viable M. leprae as a reasearch reagent.* *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 69(1):1-12. 2001.
201. **Patrocínio L.G., Goulart I.M., Goulart L.R., Patrocínio J.A., Ferreira F.R., Fleury R.N.** *Detection of Mycobacterium leprae in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction.* *FEMS Immunol Med Microbiol.* 44(3):311-6. 2005.
202. **Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M., Rozen S.G.** *Primer3 - new capabilities and interfaces.* *Nucleic Acids Res.* 40(15):e115. 2012.
203. **Da Silva Souza C., Bacha J.T.** *Delayed diagnosis of leprosy and the potential role of educational activities in Brazil.* *Lepr Rev.* 74(3):249-58. 2003.
204. **Robertson L.M., Nicholls P.G., Butlin R.** *Delay in presentation and start of treatment in leprosy: experience in an out-clinic in Nepal.* *Lepr Rev.* 271:511-6. 2000.

205. **Smith C.S., Aerts A., Kita E., Virmond M.** *Time to define leprosy elimination as zero leprosy transmission? Lancet Infect Dis.* 16(4):398-9. 2016.

8. Anhang

| | |
|---------------------------------|--|
| Inaktivierung der Mykobakterien | Inkubation der Proben bei 95°C für 15 min. und Abkühlung auf Raumtemperatur |
| Zelllyse | <ol style="list-style-type: none"> 1. Zugabe von 15µl Lysozym (10mg/ml) mit anschließender Inkubation bei 37°C für eine Stunde. 2. Zugabe von 10µl Proteinase K (20mg/ml), mit folgender Inkubation für 4 Stunden bei 55°C. 3. Inaktivierung von Proteinase K für 10 min. bei 95°C. |
| Protein Präzipitation | <ol style="list-style-type: none"> 1. Lagerung der Probe auf Eis für 5 min. 2. Hinzugabe von 230µl „Protein Precipitation Solution“ (PPS) 3. Erneute Lagerung auf Eis für 5 min. 4. Zentrifugation für 5 min bei 13 000 rpm. |
| DNA Präzipitation | <ol style="list-style-type: none"> 1. Überführung des Überstandes in neues Reaktionsgefäß und Zugabe von 700µl Isopropanol (100%). 2. Zentrifugation bei 13 000 rpm für 5 min. 3. Verwerfen des Überstandes und Hinzugabe von 700µl Ethanol (70%). 4. Zentrifugation bei 13 000rpm für 5 min und erneutes Verwerfen des Überstandes. 5. Pellets bei Raumtemperatur in offenen Reaktionsgefäßen trocknen lassen. |
| DNA Hydration | <ol style="list-style-type: none"> 1. Zugabe von 100µl „DNA Hydration Solution“ 2. Inkubation für 30 min. bei 65°C. |

Tabelle 33. Anleitung zur DNA Extraktion aus Transportpuffer CLS

| | |
|---------------------------------|--|
| Inaktivierung der Mykobakterien | Inkubation der Proben bei 95°C für 15 min. und Abkühlung auf Raumtemperatur |
| Zelllyse | Zugabe von 25µl Proteinase K mit folgender Inkubation für 30 min. bei 50°C. |
| DNA Extraktion | <ol style="list-style-type: none"> 1. Zentrifugation bei 10 000g für 1 min. 2. Entfernung des Abstrichtupfers 3. Überführung des Überstandes in das Spin Column System 4. Hinzufügen von 400µl „Binding Buffer TBS“, anschließende Zentrifugation bei 10 000g für 2 min und Verwerfen des Durchflusses 5. Zugabe von 500µl „washing buffer HS“, Zentrifugation bei 10000 g für 1 min. und Verwerfen des Durchflusses 6. Zugabe von 750µl „washing buffer MS“, Zentrifugation bei 10000 g für 1 min und Verwerfen des Durchflusses 7. Zugabe von 100 µl „Elution Buffer“ mit anschließender Inkubation für 2 min bei Raumtemperatur. 8. Zentrifugation bei 6 000g für 1min. und Verwerfen des Spin Column Systems |

Tabelle 34. Anleitung zur DNA Extraktion aus Transportpuffer TLS

| | |
|---|---|
| Inaktivierung der Mykobakterien und Stabilisierung der Proben | <p><u>RNAlater</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Inkubation für 12 Std. bei 2-8°C und anschließende Inaktivierung bei 95°C für 5 min. 2. Zentrifugation für 5 min. bei 5000g, Verwerfen des Abstrichtupfers und Überstandes <p><u>PANTA</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Zufügen von 1ml „RNA Protect Bacteria Reagent“ und Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min. 2. Inaktivierung für 5 min. bei 95°C und darauf folgende Inkubation für 5 min. auf Eis 3. Zentrifugation für 5 min. bei 5000g, Verwerfen des Abstrichtupfers und Überstandes |
| Zelllyse | <ol style="list-style-type: none"> 1. Überführen des Pellets auf Eis und Hinzugabe von 100µl CLS, 20µl Proteinase K und 15µl Lysozym 2. Inkubation für 15 min. bei 37°C und darauf folgende Inkubation für 45 min. bei 55°C 3. Zugabe von 350µl „Buffer RLT Plus“, Homogenisierung des Lysates und Überführung in ein Spin Column System 4. Zentrifugation bei 9000g für 30 sek. 5. Durchfluss wird der RNA Extraktion, das Spin Column System der DNA Extraktion zugeführt. |
| RNA Extraktion und Reinigung | <ol style="list-style-type: none"> 1. Zugabe von 350µl Ethanol (70%), Überführung in „RNeasy Spin Column“ System und Zentrifugation bei 9000g für 15 sek. 2. Verwerfen des Durchflusses, Hinzugabe von 700µl „Buffer RW1“ und Zentrifugation bei 9000g für 15sek. 3. Verwerfen des Durchflusses, Hinzugabe von 500µl „Buffer RPE“ und Zentrifugation bei 9000g für 15 sek. 4. Verwerfen des Durchflusses, Hinzugabe von 500µl Ethanol (80%) und Zentrifugation bei 9000g für 2 min. 5. Verwerfen des Durchflusses, anschließende Zentrifugation mit geöffnetem Deckel bei 9000g für 5 min und erneutes Verwerfen des Durchflusses 6. Zugabe von 25µl RNase freies Wasser, Zentrifugation bei 9000g für 1 min. und Überführen des Reaktionsgefäßes auf Eis |
| Reverse Transkription von RNA in cDNA | <ol style="list-style-type: none"> 1. Zugabe von 1µl reverse Transkriptase, 5µl „RT Reaction Buffer“ und 2µl RNase freies Wasser 2. Inkubation bei 42°C für 15 min. und darauf folgende Inaktivierung der reversen Transkriptase bei 95°C für 3 min. |
| DNA Extraktion und Reinigung | <ol style="list-style-type: none"> 1. Zugabe von 500µl „Buffer AW1“ zum Spin Column System (Schritt 4. der Zelllyse) 2. Zentrifugation bei 9000g für 15 sek, Verwerfen des Durchflusses und Zugabe von 500µl „Buffer AW 2“. 3. Zentrifugation bei 9000g für 2 min., Verwerfen des Durchflusses und Hinzufügen von 50µl „Buffer EB“ (70°C erhitzt) 4. Inkubation für 2 min. bei Raumtemperatur, anschließende Zentrifugation bei 9000g für 1 min. und Verwerfen des Spin Column System |

Tabelle 35. Anleitung zur kombinierten RNA/DNA Extraktion aus den Transportpuffern RNAlater und PANTA

| Bakterienspezies | Herkunft ^a | Ursprung ^b | RLEP-qPCR Ergebnis ^c | TTC-qPCR Ergebnis ^d | 16S rRNA RT-qPCR Ergebnis ^e |
|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--|
| <i>Escherichia coli</i> | MVP | Humanes Isolat ^p | - | - | - |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | MVP | Humanes Isolat ^p | - | - | - |
| <i>Propionibacterium acnes</i> | MVP | Humanes Isolat ^p | - | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | MVP | Humanes Isolat ^p | - | - | - |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | MVP | Humanes Isolat ^p | - | - | - |
| <i>M. goodii</i> | NRZ | Humanes Isolat ^p | - | - | - |
| <i>M. avium</i> | NRZ | Humanes Isolat ^p | - | - | - |
| <i>M. abscessus</i> | NRZ | Humanes Isolat ^p | - | - | - |
| <i>M. kansasii</i> | NRZ | Humanes Isolat ^p | - | - | - |
| <i>M. xenopi</i> | NRZ | Humanes Isolat ^c | - | - | - |
| <i>M. fortuitum</i> | NRZ | Humanes Isolat ^c | - | - | - |
| <i>M. intracellulare</i> | NRZ | Humanes Isolat ^p | - | - | - |
| <i>M. marinum</i> | NRZ | Humanes Isolat ^p | - | - | - |
| <i>M. malmoense</i> | NRZ | Humanes Isolat ^c | - | - | - |
| <i>M. africanum</i> | NRZ | Humanes Isolat ^p | - | - | - |
| <i>M. bovis</i> | NRZ | Bovines Isolat ^p | - | - | - |
| <i>M. microti</i> | NRZ | Maus Isolat ^p | - | - | - |
| <i>M. tuberculosis</i> | NRZ | Humanes Isolat ^p | - | - | - |

Tabelle 36. Ergebnisse der Spezifitätstestung

^a Die DNA Extrakte wurden zur Verfügung gestellt vom Max von Pettenkofer-Institut; Ludwig-Maximilians-Universität, München (MVP), dem Nationalen Referenzzentrum für Mykobakterien, Borstel (NRZ) und AITM

^b Die Isolate wurden in potentiell pathogene Erreger ^p und Kommensale/mögliche Kontaminanten ^c der klinischen Proben eingeteilt.

^c Ergebnis der RLEP qPCR der DNA Extrakte; “+“ zeigt ein positives und “-“ negatives Ergebnis an

^d Ergebnis der TTC qPCR der DNA Extrakte; “+“ zeigt ein positives und “-“ negatives Ergebnis an

^e Ergebnis der 16S rRNA RT- qPCR der DNA Extrakte; “+“ zeigt ein positives und “-“ negatives Ergebnis an

MDL/Heiser Leprosy Study

Catégorie : Patient de Lèpre

J: Degré d'infirmité

☐ 0

☐ 1

☐ 2

K: Exanthèmes cliniques

☐

Validation technique (2012)

| Exanthème | Location | Milieu du transport | ID d'exanthème | Exanthème positif | Exanthème dans (NHI) | Signature (NHI) |
|-----------------|---------------|---------------------------|----------------|--------------------------|--------------------------|-----------------|
| Exanthème tache | cutané droit | TLS (400µ/licevoil) | NL.T.1 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Exanthème tache | cutané droit | CLS (700µ/licevoil) | NL.C.1 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Exanthème tache | cutané gauche | TLS (400µ/licevoil) | NL.T.1 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Exanthème tache | cutané gauche | CLS (700µ/licevoil) | NL.C.1 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Exanthème tache | cutané droit | FANT/1 (500µ/licevoil) | NL.P.1 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Exanthème tache | cutané droit | RNA inner (500µ/licevoil) | NL.R.1 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Exanthème tache | cutané gauche | FANT/1 (500µ/licevoil) | NL.P.1 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Exanthème tache | cutané gauche | RNA inner (500µ/licevoil) | NL.R.1 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |

☐

Validation clinique (2013)

| Exanthème | Location | Milieu de transport | ID d'exanthème | Exanthème positif | Exanthème dans (NHI) | Signature (NHI) |
|-----------------|---------------|---------------------------|----------------|--------------------------|--------------------------|-----------------|
| Exanthème tache | cutané gauche | RNA inner (500µ/licevoil) | NL.R.2 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Exanthème tache | cutané gauche | RNA inner (500µ/licevoil) | NL.R.2 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Exanthème tache | cutané droit | CLS (700µ/licevoil) | NL.C.2 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Exanthème oral | labiale | RNA inner (500µ/licevoil) | SL.R.2 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Exanthème oral | labiale | CLS (700µ/licevoil) | SL.C.2 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| «à érin émar» | labio | RNA inner (500µ/licevoil) | SL.R.2 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| «à érin émar» | labio | CLS (700µ/licevoil) | SL.C.2 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| «à érin émar» | labiale | RNA inner (500µ/licevoil) | SL.R.2 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| «à érin émar» | labiale | CLS (700µ/licevoil) | SL.C.2 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |

L: Remarque

M: Nom et signature du prescripteur

Data entry form D1

Version 2

09.02.2012

[illegible]

126

Certificate

mdc medical device certification GmbH
certifies that

GenExpress
Gesellschaft für
Proteindesign mbH

**Eresburgstraße 22-23
12103 Berlin
Germany**

for the scope
contract research in molecular biology
and production of standards for the PCR diagnostic

has introduced and applies a

Quality Management System

The mdc audit has proven that this quality management system
meets all requirements of the following standard

EN ISO 9001

Quality management systems –
Requirements
(ISO 9001:2008)

| | |
|------------------|------------------------|
| Valid from | 2011-01-04 |
| Valid until | 2014-01-03 |
| Registration no. | 1425.57.01/0 |
| Report no. | E 1425.57 / 2011-01-04 |
| Stuttgart | 2011-01-04 |

P. Hauer
Head of Certification Body



mdc medical device certification GmbH
Kriegerstraße 6
D-70191 Stuttgart, Germany
Phone: +49-(0)711-253597-0
Fax: +49-(0)711-253597-10
Internet: <http://www.mdc-ce.de>

For electronic publication only

Abbildung 10. GenExpress Zertifikat

| | | | |
|----------|------------------------------------|---------------|-------------------|
| Organism | Mycobacterium leprae (RLEP) | plasmid No. | 30-8786-01 |
| | | insert length | 275 bp |

cloned fragment:

5'-GCACGGTATAACTATTCGCACCTGATGTTATCCCTTGCACCATTTCTGCCGC
TGGTATCGGTGTCGGCGGCTTGTTGACCGGCCCTCAGCCAGCAAGCAGGCATG
CCGCCGGGTGCAGCAGTATCGTGTTAGTGAACAGTGCATCGATGATCCGGCCG
TCGGCGGCACATACGGCAACCTTCTAGCGCAGATCAACCACCCACACCCCACC
AGCCCACCACAACACCACCCAAACCAAACCAGCAAAAAATAACCACCAAATG
ACCATCACGACG-3'

Assay:

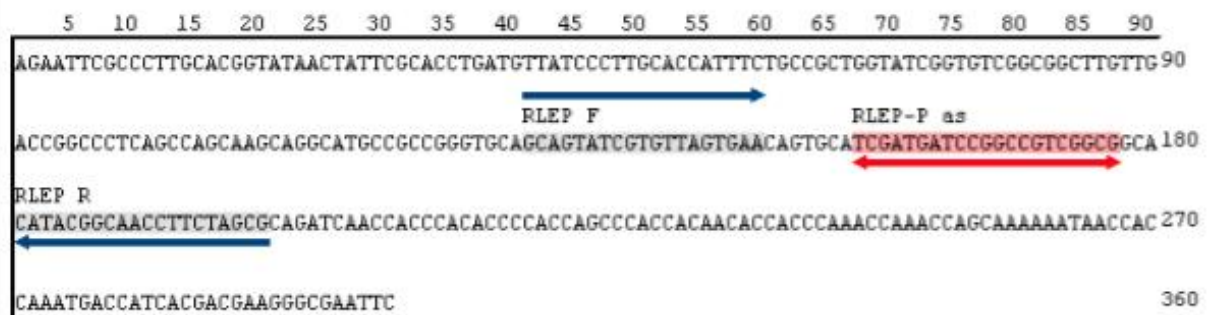


Abbildung 11. Sequenz RLEP Gen Standard

| | | | |
|----------|--|---------------|-------------------|
| Organism | Mycobacterium leprae (16S rRNA) | plasmid No. | 30-8803-01 |
| | | insert length | 463 bp |

cloned fragment:

5'-GGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAA
AGGTCTCTAAAAAATCTTTTTTAGAGATACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAA
CACGTGGGTAATCTGCCCTGCACTTCAGGGATAAGCTTGGGAAACTGGGTCTA
ATACCGGATAGGACTTCAAGGCGCATGTCTTGTGGTGGAAAGCTTTTTGCGGT
GCAGGATGGGCCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGACGGCCTACCAAG
GCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTACGGCCACACTGGGACTGAGA
TACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGC
GCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCTTTCGGGTTGTAAG
CCTCTTTCACCATCGACGAAGGTCTGGGTTTTCTCGGATTGAC-3'

Assay:

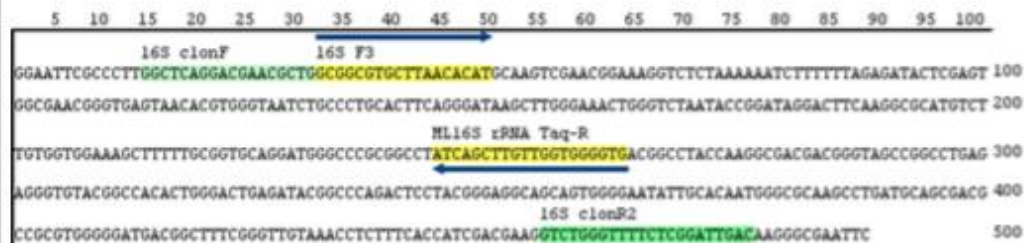


Abbildung 13. Sequenz 16S rRNA Gen Standard

II. FORMULAIRE DE CONSENTEMENT POUR LA PARTICIPATION A L'ETUDE DE « MOLECULAR DIAGNOSIS OF LEPROSY » (Diagnostic moléculaire de la lèpre)

Catégorie : Patient MB (index case)

FEUILLE D'INFORMATION

Titre de la recherche:

« Molecular diagnosis of leprosy »

enregistré comme projet à l'ILEP (International Federation of Anti-Leprosy Associations) sous No. 7.01.02.50 "Diagnostic DITM").

Nom(s) et affiliation(s) du chercheur(s) de la demande(s):

Dr. Basil KOBARA, PNLUB-LP, Lomé, Togo

Dr. Abiba BANLA KERE, INH, Lomé, Togo

Dr. Kossi BADZIKLOU, INH, Lomé, Togo

Mr. Franz Xaver WIEDEMANN, DAHWT, Lomé, Togo

Dr. Komi AMEKUSE, DAHWT, Lomé, Togo

PD Dr. Gisela BRETZEL, DITM/LMU, Munich, Allemagne

Dr. Marcus BEISSNER, DITM/LMU, Munich, Allemagne

Objectifs de la recherche:

L'objectif général de cette étude est de développer et valider des tests moléculaires pour l'identification de porteurs sains infectés par le *Mycobacterium leprae* avant la manifestation clinique de la maladie. Ces méthodes sont aussi applicables pour d'autres questions cliniques liées au traitement de la lèpre.

A ce sujet, 3 différents tests moléculaires seront établis à l'Institut National d'Hygiène à Lomé et des autres laboratoires au Togo.

PNLUB – LOME – TEL.: +228-22208645 - DAHW – BP2271 – LOME – TEL.: +228-22232230

1

Afin de développer, valider ces tests et les implémenter au Togo, il faut analyser un certain nombre des échantillons de patients de lèpre. Pour cette raison, les chercheurs du Togo et de l'Allemagne, analyseront l'ADN et l'ARN de *Mycobacterium leprae* des échantillons des patients de lèpre. Ils étudieront la sensibilité et la spécificité des tests moléculaires. Puis, ces tests sont destinés à l'identification des porteurs silencieux / porteurs sains vivant dans les familles et dans l'environnement social des patients.

Procédure de la recherche:

Dans le cadre de l'examen clinique, les chercheurs recherchent également la cicatrice du vaccin BCG et demandent également le remplissage d'un questionnaire. Celui-ci inclut des informations sur des activités quotidiennes et recherche des causes pour une infection avec *M. leprae*.

Tous les individus avec une suspicion clinique de l'infection avec la lèpre seront examinés spécifiquement pour la lèpre pour afin d'un traitement standard en cas d'un résultat positif.

Les examens de laboratoire ne sont pas des tests de routine pour le diagnostic de la lèpre et ne sont pas effectués si vous ne participez pas à l'étude.

Différents types d'échantillons diagnostiques seront prélevés, soit des écouvillons nasaux, oraux et des échantillons superficiels de lymphes « slit skin smears » de l'oreille et des lésions des patients de lèpre avant un début de traitement et analysés par différentes méthodes de laboratoire.

Si vous êtes sous traitement, il pourrait être nécessaire que d'échantillons nasaux additionnels seront prélevés pour des raisons diagnostiques afin de découvrir si il y a encore des bacilles viables dans le corps.

Des patients âgés de moins de 5 ans ne seront pas être intégrés dans l'étude. Au cas où vous souffrez d'une forme multibacillaire de la lèpre, il peut être nécessaire d'évaluer les échantillons du foyer ou des contacts sociaux pour voir s'ils ne sont pas infectés par *M. leprae*. Dans ce cas, il devient nécessaire d'expliquer à la personne de contact qu'elle pourrait être infectée par *M. leprae* et il n'est pas toujours possible d'éviter qu'elle prenne conscience de souffrir de la lèpre. MAIS nous ne contacterons que les personnes que vous nous indiquez (un maximum de 10) et SEULEMENT quand vous nous en exprimez clairement votre accord !

Volontariat:

PNLUB – LOME – TEL.: +228-22208645 - DAHW – BP2271 – LOME – TEL.: +228-22232230

2

Abbildung 14. Patienteneinverständniserklärung (Seiten 1 und 2)

Votre participation dans cette étude est entièrement volontaire. Si vous ne voulez pas prendre la décision de participer à cette étude maintenant, ou si vous avez besoin plus de temps pour prendre une participation en considération, vous pouvez discuter ultérieurement avec l'équipe de recherche au sujet de votre participation à l'étude.

Si vous n'acceptez pas d'avoir votre ménage et les contacts sociaux publiés pour l'identification ceux qui parmi eux seraient transmetteurs silencieux, vous pouvez toujours participer à cette étude en tant que patient MB sans index. Dans ce cas, il vous sera donné un autre formulaire de consentement éclairé.

Risque(s):

Prélever une petite quantité de liquide corporel peut causer un peu de douleur pendant l'incision superficielle avec un scalpel. À cause de prise de lymphes, un petit hématome peut se former. Dans le cas où vous soupçonneriez un effet secondaire, vous êtes prié de le rapporter à l'équipe de recherche, svp.

Avantage(s):

Sans ou avec participation dans cette étude, tout patient avec un diagnostic clinique positif bénéficiera du régime de traitement standard de l'Organisation Mondiale de la Santé, c.-à-d. 6 ou 12 mois de traitement antibiotique, sans confirmation d'un échantillon au laboratoire. Les analyses au laboratoire additionnelles ne sont pas nécessaires pour traiter votre maladie. Vous recevrez des tests diagnostiques additionnels avec des méthodes nouvelles et sensibles qui vérifient le diagnostic clinique de la lèpre, en cas de participation.

Si vous êtes sous traitement antibiotique et vous ne répondez pas bien aux antibiotiques, il est possible de tester si la bactérie est encore vivante et ceci aidera le médecin traitant à décider si un traitement différent/supplémentaire est nécessaire.

L'objectif de cette recherche est de développer des tests pour une détection précoce des personnes contacts (enfants, membres des familles, voisins, etc.) des patients lèpre pour identifier des porteurs sains.

Les patients lèpre qui participeront à l'étude n'ont pas un bénéfice clinique immédiat. Les résultats de l'étude devaient fournir des résultats précieux qui favorisent le développement des tests moléculaires pour identifier des porteurs sains. Cette approche permet un suivi rapproché des porteurs sains pour assurer une prise en charge clinique très rapide dès que des symptômes apparaissent, et d'empêcher une éventuelle invalidité causée par la maladie.

Confidentialité:

PNLUB – LOME – TEL: +228-22208645 - DAHW – BP2271 – LOME – TEL: +228-22232230

3

Tous les échantillons prélevés dans cette étude recevront un numéro de code. Pour le traitement de ces échantillons ou analyse des résultats obtenus, seuls ces numéros de code seront utilisés. Ainsi aucune des données et informations obtenues de vous n'apparaîtra nulle part avec votre nom et ne pourra d'aucune manière être reliée à vous. Votre nom ou votre identification (même pas votre numéro de code) ne sera utilisé dans aucune publication ou rapport de cette étude. Si nécessaire, le contrôleur, c.-à-d. les autorités du comité d'éthique médical, seront autorisées à consulter les dossiers des participants pour vérifier les procédures de l'essai clinique, sans violer la confidentialité.

Exigences de temps à la participation:

L'exigence de temps à la participation sera environ 20 minutes pour le prélèvement des échantillons diagnostiques et environ 10 minutes pour répondre aux questions sur les activités potentielles entraînant une exposition à la lèpre.

Alternatives à la participation:

Si vous choisissez de ne pas participer ou si vous choisissez de vous retirer, ceci n'affectera d'aucune manière le traitement de votre famille ou des membres de la communauté, ou n'importe quel futur traitement. Si vous voulez vous retirer, vous pouvez le faire sans vous justifier.

Conséquences de la décision des participants de leur retrait à la recherche et procédure pour l'achèvement ordonné de la participation :

Si vous voulez vous retirer de cette étude, après que les échantillons initiaux ont été prélevés, et vous ne voulez pas que vos échantillons soient traités davantage, nous pouvons les enlever et les écarter immédiatement après votre demande ou celle de votre représentant légal. Une notification écrite de cette demande sera établie par l'équipe de recherche.

Questions:

Si une question devrait se présenter au sujet de l'étude, vous pouvez la poser à l'équipe de recherche ou le médecin suivant.

Le nom du médecin qui pourra être contacté: Dr. AMEKUSE, DAHWT

Le numéro de téléphone : +228-22.23.22.30

PNLUB – LOME – TEL: +228-22208645 - DAHW – BP2271 – LOME – TEL: +228-22232230

4

Abbildung 15. Patienteneinverständniserklärung (Seiten 3 und 4)

FORMULAIRE DE CONSENTEMENT

Déclaration de la personne procurant le consentement:

Par la présente je confirme avoir expliqué entièrement cette étude à _____ (nom du patient et/ou représentant légal) et avoir donné suffisamment d'informations relatives aux risques et avantages, pour pouvoir prendre une décision informée.

NOM: _____

DATE: _____ SIGNATURE: _____

PNLUB – LOME – TEL.: +228-22208645 - DAHW – BP2271 – LOME – TEL.: +228-22232230

5

Déclaration de la personne recevant le consentement:

Par la présente, je confirme d'avoir lu la description de l'étude ou avoir reçu la traduction dans la langue que je comprends. J'en ai discuté aussi avec l'intervieweur avec satisfaction. J'ai compris que ma participation à l'étude est volontaire. Je maîtrise suffisamment les informations sur le but, les méthodes, les risques et les avantages de l'étude pour juger que je veux participer à cette étude. J'ai compris que je pourrais me retirer librement de cette étude à n'importe quel moment. J'ai reçu une copie de ce formulaire de consentement et la feuille d'information additionnelle, pour garder en ma possession. J'ai eu assez de temps pour réfléchir et considérer ma participation à cette étude.

DATE: _____

SIGNATURE/EMPREINTE DIGITALE: _____

Si âgé < 18 ans:

SIGNATURE/EMPREINTE DIGITALE DU REPRESENTANT LEGAL: _____

NOM DU REPRESENTANT LEGAL: _____

Si témoin est illettré durant l'obtention du consentement:

DATE ET SIGNATURE DU TEMOIN: _____

NOM DU TEMOIN: _____

PNLUB – LOME – TEL.: +228-22208645 - DAHW – BP2271 – LOME – TEL.: +228-22232230

6

Abbildung 16. Patienteneinverständniserklärung (Seiten 5 und 6)

MINISTERE DE LA SANTE

CABINET

DIRECTION GENERALE DE LA SANTE

DIRECTION DES PHARMACIES LABORATOIRES
ET EQUIPEMENTS TECHNIQUES

COMITE DE BIOETHIQUE POUR
LA RECHERCHE EN SANTE (CBRS)

N° 2807 /2012/MS/CAB/DGS/DPLET/CBRS

REPUBLIQUE TOGOLAISE

Travail Liberté Patrie

Le **Ministre de la Santé**, soussigné, considérant l'avis du Comité de Bioéthique pour la Recherche en Santé (CBRS) n° 012/2012/CBRS du 02 novembre 2012 ci-joint, **autorise** l'exécution du protocole de recherche suivant :

Projet : « Molecular diagnostics of leprosy (Validation et décentralisation des technologies d'un diagnostic moléculaire de la lèpre) »

Financement : DAHW et The New York Community Trust, Heiser Program

Promoteur : DAHW

Présenté par : M. Franz Xaver WIEDEMANN – Septembre 2012

Exécuté par :

- Institut National d'Hygiène (TOGO)
- Institut de Médecine Tropicale de l'Université de Munich (Allemagne)

En foi de quoi, la présente autorisation est délivrée au promoteur pour servir et valoir ce que de droit.



Lomé, le

Professeur
Kondi Charles AGBA

Abbildung 17. Ethikvotum (Seite 1)

MINISTERE DE LA SANTE

C A B I N E T

DIRECTION GENERALE DE LA SANTE

DIRECTION DES PHARMACIES LABORATOIRES
ET EQUIPEMENTS TECHNIQUES

**COMITE DE BIOETHIQUE POUR
LA RECHERCHE EN SANTE (CBRS)**

REPUBLIQUE TOGOLAISE

Travail Liberté Patrie

Projet : « Molecular diagnostics of leprosy (Validation et décentralisation des technologies d'un diagnostic moléculaire de la lèpre) »

Financement : DAHW et The New York Community Trust, Heiser Program

Promoteur : DAHW

Présenté par : M. Franz Xavier WIEDEMANN – Septembre 2012

Exécuté par :

- Institut National d'Hygiène (TOGO)
- Institut de Médecine Tropicale de l'Université de Munich (Allemagne)

AVIS N° 012 /2012/CBRS

Le Comité de Bioéthique pour la Recherche en Santé (CBRS) s'est réuni le 02 novembre 2012 pour évaluer le protocole de recherche relatif à « Molecular diagnostics of leprosy (Validation et décentralisation des technologies d'un diagnostic moléculaire de la lèpre) ».

A l'issue de la mise en commun des rapports d'étude présentés par une personne ressource, le CBRS s'est prononcé sur :

1- La validité scientifique du projet de l'étude

- Hypothèse scientifique : Elle est clairement définie
- Le thème de la recherche est pertinent et mérite d'être abordé
- Objectifs de l'étude : Clairement définis.
- Justification scientifique du nombre de participants : Clairement expliquée et argumentée
- Documentation scientifique : Il existe des références scientifiques assez fournies.
- Le design de l'étude est bon
- En ce qui concerne les hypothèses au sujet des paramètres de performance indiquées à la page 6, il vaudra mieux indiquer un intervalle de confiance avec un risque alpha

Abbildung 18. Ethikvotum (Seite 2)

pour la validité de la sensibilité, de la spécificité et des valeurs prédictives positives et négatives des tests au lieu d'indiquer la valeur de 100 pour chaque paramètre

- La méthodologie :
- ✓ Dans le descriptif, il n'apparaît pas clairement le ou les lieux de la mise en œuvre des techniques de biologies moléculaires, étant entendu que le recrutement se fera dans les chef-lieux des six régions sanitaires du Togo
- ✓ La durée de l'étude est de 5 ans, comment va se faire le suivi des inclusions ?
- ✓ A quel rythme vont se faire les prélèvements chez les patients sous traitements ?

2- L'acceptabilité éthique du protocole d'étude

- Modalités de recrutement des participants : Notice d'information et formulaire de consentement disponibles
- Le consentement éclairé des participants est requis.
- Confidentialité : les mesures de protection des données personnelles sont acceptables.

3- La conclusion

Le CBRS, à l'unanimité des ses membres présents, a émis un avis **favorable**. Le CBRS estime que dans sa présentation actuelle (version améliorée) l'étude relative à « Molecular diagnostics of leprosy (Validation et décentralisation des technologies d'un diagnostic moléculaire de la lèpre) » **peut être exécutée au Togo**.

Néanmoins, le promoteur devra se conformer aux observations susmentionnées du CBRS. Des réponses claires devront être apportées aux interrogations du CBRS avant le début de l'étude.

Son promoteur devra adresser au CBRS à la fin de l'étude une copie du rapport final.

Fait à Lomé, le 02 novembre 2012

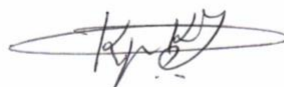
Le Rapporteur :



Mr. ALEZA Mazabalo




La Présidente et P.O
Le Vice-Président





Révérend Père Laurent KPOGO

Abbildung 19. Ethikvotum (Seite 3)



Standard Operating Procedure (SOP)

P1.c - Sample Collection from Leprosy Patients

DAHWT/INH/DITM
Version 4
10.02.2013

1. General considerations

This document describes the standard operating procedures (SOP) applied for collection, transport and storage of diagnostic specimens from multibacillary (MB) and paucibacillary (PB) leprosy patients.

This study aims to develop and evaluate novel molecular tools to detect *M. leprae* in several groups of leprosy patients and to identify viable bacilli by means of RNA assay. The study is part of a comprehensive study on molecular diagnosis of Leprosy (MDL) that also covers the issue of identification of possible silent transmitters.

Sample collection, transport and storage of the clinical samples from leprosy contacts are described in SOP P1.b.

If written informed consent is provided, MB cases enrolled in this study serve as index cases for the recruitment of contacts for the identification of silent transmitters of Leprosy. For technical validation clinical samples as indicated in Table 1 will be analysed.

Table 1.

| Patient cohort | Study phase | Samples collected per study participant | | | |
|-------------------------------|----------------------|---|----------------|---------------|-------------------------|
| | | Samples type | No. of samples | Body site | Transport buffer |
| 20 MB patients, pre-treatment | technical validation | Nasal swab | 1 | right nostril | TLS (400µl/sample) |
| | | Nasal swab | 1 | right nostril | CLS (700µl/sample) |
| | | Nasal swab | 1 | left nostril | TLS (400µl/sample) |
| | | Nasal swab | 1 | left nostril | CLS (700µl/sample) |
| | | Nasal swab | 1 | right nostril | PANTA™ (500µl/sample) |
| | | Nasal swab | 1 | right nostril | RNAlater (500µl/sample) |
| | | Nasal swab | 1 | left nostril | PANTA™ (500µl/sample) |
| | | Nasal swab | 1 | left nostril | RNAlater (500µl/sample) |

For clinical validation clinical samples as indicated in Table 2 will be analysed.

SOP 1.c

Version 4

10.02.2013

1

Table 2.

| Patient cohort | Study phase | Body site | Samples collected per study participant | | | | Order of sample collection | Lab work (extraction) |
|------------------------------------|---------------------|--------------------------------|---|----------------|--------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------|
| | | | Samples type | No. of samples | Body site | Transport buffer | | |
| 50 PB + MB patients, pre-treatment | Clinical validation | 1. Nose | Nasal swab | 1 | left nostril | RNAlater (500µl/sample) ● | ↓ | INH |
| | | | Nasal swab | 1 | left nostril | RNAlater (500µl/sample) ● | | DITM ¹ |
| | | | Nasal swab | 1 | right nostril | CLS (700µl/sample) ● | | INH/DITM |
| | | 2. Mouth | Buccal swab | 1 | oral mucosa | RNAlater (500µl/sample) ● | | INH |
| | | | Buccal swab | 1 | oral mucosa | CLS (700µl/sample) ● | | DITM ¹ |
| | | | Buccal swab | 1 | oral mucosa | CLS (700µl/sample) ● | | INH/DITM |
| | | 3. Ear lobe ² | Slit skin smear | 1 | ear lobe | RNAlater (500µl/sample) ● | | INH |
| | | | Slit skin smear | 1 | ear lobe | CLS (700µl/sample) ● | | INH/DITM |
| | | 4. leprosy lesion ² | Slit skin smear | 1 | most active lesion | RNAlater (500µl/sample) ● | | INH |
| | | | Slit skin smear | 1 | most active lesion | CLS (700µl/sample) ● | | INH/DITM |

¹These samples are subjected to external quality assurance at DITM (only from the first 20 patients!)

²Choose the same ear lobe/lesion for DNA and RNA samples! The lesion must be one of the clinically most actively inflamed lesions!

As this is a validation study opposed to the procedures described for clinical samples from contacts (SOP P1b), this part of the study includes samples for DNA (CLS buffer) and RNA (RNAlater buffer) detection at the same time.

▲ **Note: Samples for RNA analyses (in RNAlater) buffer must be collected prior to the samples for DNA analyses (in CLS buffer) at the respective body site!**

▲ **Note: Every leprosy lesion and ear lobe, samples are collected from, is documented by taking a picture!**

This SOP is based on ILEP/WHO recommendations for collection of diagnostic specimens from leprosy patients.

SOP 1.c

Version 4

10.02.2013

2

Abbildung 20. SOP.1c: Probenentnahme (Seiten 1 und 2)

2. Recruitment of Study Participants

2.1 General procedure

▲ **Before any study participant is enrolled in this study and clinical specimens are collected, ensure that informed consent of all patients has been obtained!**

Before recruitment of study participants inclusion criteria must be checked:

1. All clinically suspected leprosy patients (PB + MB)
2. Over the age of 5 years
3. Antibiotic naïve presentation (new cases)
4. Informed consent provided

For MB leprosy patients that serve as index case the ICF I1 (Category: MB patient – index case) and for all other PB and MB leprosy patients the ICF I2 (Category MB or PB patient – non-index case) has to be signed (thumb print in case of illiterates) by the study participant or his legal representative (if aged under 18 years) and the study nurse/medical doctor obtaining consent. One signed original remains with the patient and one signed original remains with the medical team.

Next, the study participant is assigned a unique sample ID (see 3). The ID is written on the laboratory data entry form (form D1) and clinical samples are labelled accordingly (collection tubes are provided by INH, see table 8). Names do not appear on any study forms, are however available on a master list which is only accessible for the local medical doctors.

All required data are filled in the laboratory data entry form "D1".

3. Patient & Sample ID System

4. The **Sample ID** consists of a Patient ID, Sample Code and a Laboratory Code

Table 3. Sample ID

| Sample ID | | |
|------------|-------------|-----------------|
| Patient ID | Sample Code | Laboratory Code |

3.1 Patient ID (provided by DAHW)

The Patient ID as indicated in table 4 must be entered in the laboratory data entry form D1. The patient ID constitutes the first part of each sample code.

SOP 1.c

Version 4

10.02.2013

3

Table 4. Patient ID

| Patient ID | | | |
|------------|---|--|----------------------------|
| Country | Study Site | Clinical form | Serial number per patient* |
| Togo: T | TSEVIE = T SOKODE = S ATAKPAME = A KARA = K DAPAONG = D | Leprosy multibacillary : MB Leprosy paucibacillary : PB | 001-999 |

*serial numbers can be assigned to study sites in blocks (e.g. Tsevie: 001-099 etc.)

3.2 Sample ID (provided by DAHW)

The **sample code** (see table 5) follows the **patient ID** and both together constitute the **sample ID**. The **sample ID** is provided on the laboratory data entry form "D1", and each sample tube must be labelled with the entire **sample ID** (i.e. **Patient ID + Sample code**) by DAHWT.

Table 5. Sample code

| Sample code | | |
|--|--------------------------|---------------------------------|
| Sample number & location of collection | Transport buffer | Study phase |
| Nasal Swab (Right nostril) = NR1 | CLS = C | Technical validation = 1 |
| Nasal Swab (Left nostril) = NL1/2 | TLS = T | Clinical validation = 2 |
| Buccal Swab = B1/2 | PANTA = P | |
| Slit Skin Smear (ear lobe) = SE | RNA _{later} = R | |
| Slit Skin Smear (lesion) = SL | | |

So

4

Abbildung 21. SOP.1c: Probenentnahme (Seiten 3 und 4)

Example of labelling:

The first right nasal swab samples in CLS from patient T.T.MB.001 (Patient ID) will be labelled as follows:

Sample ID: T.T.MB.001.NR1.C.1[or 2]

3.3 Laboratory Sample Code (provided by INH upon processing of samples)

The **laboratory sample code** will be added by INH to the sample ID to generate the **laboratory sample ID** upon processing of samples at INH and noted in the INH laboratory register. This final code consists of the **sample ID** (provided by DAHW) and an additional **laboratory sample code** as shown in table 6.

Table 6. Laboratory code

| Laboratory code |
|-----------------------------------|
| Laboratory Status of Sample |
| Inactivated sample in TLS/CLS = i |
| DNA extract = d |
| cDNA = c |
| Backup sample = b |

Example of labelling:

The first right nasal swab samples in CLS with the sample ID T.T.MB.001.NR1.C.1 [or 2] will be labeled at INH subsequently to heat inactivation as follows:

Laboratory sample ID: T.T.MB.001.NR1.C.1 [or 2].i

The final **sample ID** consists of **Patient ID**, **Sample code** and **Laboratory Code** as shown in table 7.

SOP 1.c

Version 4

10.02.2013

5

Table 7. Example









| Sample ID | | |
|------------|---------------|-----------------|
| Patient ID | Sample code | Laboratory code |
| T.T.MB.001 | NR1.C.1[or 2] | i |

5. Collection of clinical samples

4.1 Clinical specimens from suspected leprosy patients

According to the study phase (technical or clinical validation), clinical samples in the following transport buffers will be collected:

Table 8. Study phase, patient cohort samples and transport buffers

| Patient cohort | Study phase | Body site | Samples collected per study participant | | | | Order of sample collection | Lab work (extraction) |
|-------------------------------|----------------------|-----------|---|----------------|---------------|--|---|-----------------------|
| | | | Samples type | No. of samples | Body site | Transport buffer | | |
| 20 MB patients, pre-treatment | Technical validation | 1. Nose | Nasal swab | 1 | right nostril | TLS (400µl/sample)  |  | DITM |
| | | | Nasal swab | 1 | right nostril | CLS (700µl/sample)  | | DITM |
| | | | Nasal swab | 1 | left nostril | TLS (400µl/sample)  | | DITM |
| | | | Buccal swab | 1 | left nostril | CLS (700µl/sample)  | | DITM |
| | | | Buccal swab | 1 | right nostril | PANTA TM (500µl/sample)  | | INH |
| | | | Buccal swab | 1 | right nostril | RNAlater (500µl/sample)  | | INH |
| | | | Slit skin smear | 1 | left nostril | PANTA TM (500µl/sample)  | | INH |














SOP 1.c

Version 4

10.02.2013

6

Abbildung 22. SOP.1c: Probenentnahme (Seiten 5 und 6)

| | | | | | | | | |
|------------------------------------|---------------------|--------------------------------|-----------------|---|--------------------|---|---|-------------------|
| | | | Slit skin smear | 1 | left nostril | RNA ^{later} (500µl/sample)  | | INH |
| 50 PB + MB patients, pre-treatment | Clinical validation | 1. Nose | Nasal swab | 1 | left nostril | RNA ^{later} (500µl/sample)  |  | INH |
| | | | Nasal swab | 1 | left nostril | RNA ^{later} (500µl/sample)  | | DITM ¹ |
| | | | Nasal swab | 1 | right nostril | CLS (700µl/sample)  | | INH/DITM |
| | | 2. Mouth | Buccal swab | 1 | oral mucosa | RNA ^{later} (500µl/sample)  | | INH |
| | | | Buccal swab | 1 | oral mucosa | RNA ^{later} (500µl/sample)  | | DITM ¹ |
| | | | Buccal swab | 1 | oral mucosa | CLS (700µl/sample)  | | INH/DITM |
| | | 3. Ear lobe ² | Slit skin smear | 1 | ear lobe | RNA ^{later} (500µl/sample)  | | INH |
| | | | Slit skin smear | 1 | ear lobe | CLS (700µl/sample)  | | INH/DITM |
| | | | Slit skin smear | 1 | most active lesion | RNA ^{later} (500µl/sample)  | | INH |
| | | 4. leprosy lesion ² | Slit skin smear | 1 | most active lesion | CLS (700µl/sample)  | | INH/DITM |
| | | | Slit skin smear | 1 | most active lesion | CLS (700µl/sample)  | | INH/DITM |

SOP 1.c

Version 4

10.02.2013

7

4.2 Preparation of specimen collection tubes and bags

INH will provide DAHWT with the corresponding specimen collection tubes containing different transport buffers (CLS, TLS, PANTATM and RNA^{later}). DAHWT will provide sample collection bags for the field staff and labels for tubes. DAHWT is responsible for patient recruitment and sample collection including transport of samples to INH.





The respective sample collection tubes containing different buffers are prepared at INH. Each tube will be labelled with the respective colour- code at INH.

4.2.1 Material & reagents

- Mybudget medical swabs, single (BioBudget, ref# 57-B5-04-25)
- Scalpels (FEATHER Snap Japan)
- Sample collection bags (Rajapack 500)
- Labels (TANTEX NormPrint REF NO: TW-2001 or comparable)
- Cell lysis solution, 125 ml (CLS, Qiagen, ref# 158906)
- RNA^{later}, 50 ml (Qiagen, ref# 76104)
- PANTATM transport medium (protocol provided in MDL SOP P2)
- 2ml screw cap tubes (Sarstedt, ref# 72.694.100)

4.2.2 Sample collection tubes, buffers and storage conditions

The following 2 ml screw cap tubes and transport buffers are required:

- 2 ml tubes containing 400µl **TLS** (stable for 12 months below 25°C) – Color- Code: 
- 2 ml tubes containing 700µl **CLS** (stable for 12 months below 25°C) – Color- Code: 
- 2 ml tubes containing 500µl **RNA^{later}** (stable for 12 months below 25°C) – Color- Code: 
- 2 ml tubes containing 500µl **PANTATM** (stable for 6 months at 4-8°C and 1 month at 8-25°C) – Color- Code: 

▲ DNA samples (in CLS) are collected from the right nostril. And RNA samples (in RNA^{later}) are collected from the left nostril.

4.3 Clinical sample collection

▲ In Togo, clinical samples will be collected by trained medical assistants under supervision of the resident physicians only!

8

Abbildung 23. SOP.1c: Probenentnahme (Seiten 7 und 8)

Nasal Swabs

Before nasal swab samples are obtained the procedure is explained to the patients. Wear gloves for your protection!
Ask the patient to move the head back to the neck and turn the head are fully to the opposite site of the nostril you intend to collect the sample from. Carefully collect the swab sample using sterile custom made swab by circling the entire nostril. Mycobacteria are located in the nasal mucosa of the vestibule. Do not swab deeper as this is not necessary and might cause pain and provoke bleeding!
The white compound of the swab is consecutively striped off the swab stick and placed into the respective prelabelled transport tube! Ensure that all compounds are completely covered by buffers. Ensure that all required swab samples are collected per patient as indicated in table 8. The swab sample must be stored in an upright position in the sample box.

▲ **Collect 2 swab sample from the nasal mucosa of the vestibule!**

Buccal Swabs

Before buccal swab samples are obtained the procedure is explained to the patients. Wear gloves for your protection!
Ask the patient to move the head back to the neck and open the mouth widely. Carefully collect the swab sample using sterile custom made swab by circling the entire buccal mucosa of both sides of the mouth.
The white compound of the swab is consecutively striped off the swab stick and placed into the respective prelabelled transport tube! Ensure that all compounds are completely covered by buffers. Ensure that all required swab samples are collected per patient as indicated in table 8. The swab sample must be stored in an upright position in the sample box.

%

Slit (skin smears) – ear lobe

The patient is asked to sit down at ease and is explained the procedure. Before taking the smear the ear lobe is thoroughly disinfected and allowed to dry completely. One hand firmly grasps the ear lobe between finger and thumb, maintaining pressure throughout until the skin becomes pale (bloodless). After first grasping, sustained rolling movement of the thumb against the index finger may help considerably to reduce bleeding when the skin is incised. An incision is being made in the skin with sterile scalpel, about 3 mm long and 2 to 3 mm deep, that is, deep enough to penetrate the upper dermis, but not so deep as to cause bleeding. The scalpel blade is turned through 90 degrees, i.e. at a right angle to the line of the original cut and being used to scrape out tissue fluid and pulp from the tiny wound. The material is smeared from the end of the scalpel onto the custom made swab. Consecutively stripe off the white compound of the swab stick and place into the respective prelabelled transport tube! Ensure that all compounds are completely covered by buffers eventually by snapping the compound with the swab stick. Ensure that only one slit skin smear is collected per patient and body site (one from an ear lobe and one from a leprosy lesion) as indicated in table 8. The swab sample must be stored in an upright position in the sample box.

Slit (skin smears) – leprosy lesion

The patient is asked to sit down at ease and is explained the procedure. The site to be smeared is thoroughly disinfected and allowed to dry completely. A fold of the skin is taken firmly between thumb and forefinger, pressure is maintained until the skin becomes pale (bloodless), and maintained throughout the procedure. An incision is being made in the skin with sterile scalpel, about 3 mm long and 2 to 3 mm deep, that is, deep enough to penetrate the upper

9

dermis, but not so deep as to cause bleeding. NB: The most active-looking lesion (raised and reddish) has to be selected (lesions on the face are exempted from smearing!); smears are taken from the most active area of the lesion (usually the edge). The scalpel blade is turned through 90 degrees (i.e. at a right angle to the line of the original cut and is being used to scrape out tissue fluid and pulp from the tiny wound. The material is smeared from the end of the scalpel onto a custom-made swab. Consecutively stripe off the white compound of the swab stick and place into the respective pre-labelled transport tube! Ensure that all compounds are completely covered by buffers. Ensure that only one slit skin smear is collected per patient and body site (one from an ear lobe and one from a leprosy lesion) as indicated in table 8. The swab sample must be stored in a sample box.

▲ **Every leprosy lesion, samples are collected from, is documented by taking a picture. Every picture must be named with the Patient ID!**

6. Transport of clinical samples

5.1 Transport of clinical samples & study forms from the field to INH

Clinical samples are transported in sample boxes to ensure an upright position during the entire travel from the field to INH (including all corresponding ICFs [ICF 11 and ICF 12] and laboratory data entry form "D1" in a sample bag) by means of cars and motorbikes from DAHWT and National Program. Consensus transport conditions and max. transportation times for all types of clinical samples prior to processing at INH are **7 days** at max. **25°C** (the cooler, the better!).

The second page of the laboratory data entry form "D1" serves as shipping list from the field to INH.

5.2 Processing & storage of samples at INH

Clinical samples for DNA extraction (CLS, TLS samples)

Upon arrival at INH laboratories, clinical samples for DNA extraction (samples in TLS & CLS) are heat inactivated at 80°C for 20 min. labelled with the respective laboratory ID (see table 3), registered in the INH laboratory register and stored at 2-8 °C for up to 1 month or until shipment to DITM/LMU is conducted by DAHWT. INH team must inform DAHWT if samples exceed 1 month storage at INH (and DAHWT in turn informs DITM/LMU)!

Clinical samples for combined RNA/DNA extraction (RNA later, PANTA™)



Upon arrival at INH laboratories, clinical samples for combined RNA/DNA extraction (samples in RNA later, PANTA™) are labelled with the respective laboratory ID (see table 6), registered in the INH laboratory register and directly processed according to SOPs P2b & P3a. DNA and cDNA extracts are stored at -20°C until shipment to DITM/LMU is conducted by DAHWT.

5.3 Transport of clinical samples to DITM/LMU

Clinical samples and extracts are shipped to DITM/LMU following the above described procedures conducted at INH on a monthly basis with courier service at ambient temperature by DAHWT. INH is supposed to provide the shipping list S1 to DAHWT and DITM/LMU.

10

Abbildung 24. SOP.1c: Probenentnahme (Seiten 9 und 10)

| | | |
|--|---|---|
|  | Standard Operating Procedure (SOP) |  |
| P2b.INH – Preparation of PANTA™ transport medium and stabilisation of <i>Mycobacterium leprae</i> RNA/DNA in swab samples Molecular Diagnosis of Leprosy (MDL) | | |
| DITM/DAHWT/INH | <u>Version 2</u> | 15.02.2013 |

1. General considerations

This document describes the standard operating procedure for the preparation of PANTA™ transport medium and *RNA later* collection tubes to keep *Mycobacterium leprae* viable and *M. leprae* RNA/DNA conserved, respectively, during transport from the field to INH. Furthermore the stabilization of RNA/DNA from viable mycobacteria in PANTA™ samples by RNA protect treatment is described. These steps are conducted for subsequent combined whole genome DNA/whole transcriptome RNA extraction from *M. leprae* in clinical samples (P3. and P3.b) according to the following procedures:

- 1) Preparation of PANTA™ (provided by DITM/LMU) and *RNA later* (provided by INH) transport tubes for swab samples
- 2) Stabilisation of *M. ulcerans* from swab samples in PANTA™ or *RNA later*

2. Reagents, material and instruments

2.1 PANTA™ transport medium (provided by DITM/LMU)

- Dubos Broth Base, 500g (BD, Heidelberg, Germany, ref# 238510)
- Dubos Medium Albumin, 12x20 ml (BD, ref# 230910)
- BBL MGIT PANTA™, 6 pcs. (BD, ref# 245114)
- Glycerol (1,2,3-Propantriol), 99.5% p.a., 1L (e.g. Roth, Karlsruhe, Germany, ref# 3783.1)
- H₂O, molecular grade, 1 L (Carl Roth, Essen, Germany, ref# T143.3)
- 2 ml RNAse/DNAse free screw cap tube (Sarstedt, Nümbrecht, Germany, ref# 72.694.100)
- Rack for tubes, sterile 1L glass bottle, bottle top filters, Laminar Flow Cabinet

2.2 RNA later transport medium (conducted at INH)

- *RNA later* RNA stabilization reagent (Qiagen, Hilden, Germany, ref# 76104)
- 2 ml RNAse/DNAse free screw cap tube (Sarstedt, Nümbrecht, Germany, ref# 72.694.100)

1

- 1000µl pipette filter tips, DNase/RNase free (e.g. Kisker, Steinfurt, Germany)
- Rack for tubes, 1000 µl pipette, Laminar Flow Cabinet

2.3 Stabilisation of mycobacterial RNA/DNA from swab samples in PANTA™

- 2 ml tubes with 500 µl PANTA™ (provided by DITM/LMU)
- RNA Protect Bacteria reagent, 2x100ml (Qiagen, Hilden, Germany, ref# 76506)
- Biosafety cabinet, class II
- *Centrifuge Thermomixer*, Freezer (-20°C/-80°C)

2

Abbildung 25. SOP2.b: Weiterverarbeitung der RNA/ DNA Proben (Seiten 1 und 2)

3. Preparation of PANTA™ transport medium (at DITM/LMU)

▲ Work under sterile conditions in a laminar Flow!

- 1) Distil 850 ml water and filter through sterile bottle top filter.
- 2) Filter glycerol through sterile bottle top filter (this will take a while due to the consistency).

▲ Glycerol is heat labile!

- 3) Dissolve 1.5 g Dubos Broth Base in 204 ml distilled water and autoclave for 15 min. at 121°C. Allow the solution to cool down to approx. 50°C before adding 12 ml of filtered glycerol and 24 ml Dubos Medium Albumin.
- 4) Dissolve 2 vials of BBL MGIT PANTA™ (Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixic acid, Trimethoprim, Azlocillin) in 3 ml filtered distilled water each to obtain PANTA™ antibiotic mixture.
- 5) For the preparation of PANTA™ transport medium add 6 ml of PANTA™ antibiotic mixture to the autoclaved Dubos Broth Base/glycerol mixture under sterile conditions.
- 6) To check sterility add 1 ml PANTA™ transport medium under sterile conditions to two 2 ml screw cap tubes each and incubate at 36°C for 24h (tube 1) and 1 week (tube 2) respectively. A clear medium indicates sterility while a turbid medium indicates contamination with bacteria (tube 1) and/or fungi (tube 2). In case of contamination discard the medium and prepare a new batch PANTA™ transport medium before use.

▲ Store 500 µl PANTA™ transport medium in 2 ml screw cap tubes at 4-8°C for max. 6 months!

- 7) Provide DAHWT with required amounts of PANTA™ transport tubes upon request (40 tubes for phase I, see SOP P1 for labelling instructions).

4. Preparation of RNAlater transport medium (at INH)

RNAlater RNA Stabilization Reagent may form a precipitate during storage below room temperature (15–25°C). In this case, redissolve the precipitate by heating to 37°C with agitation before use.

▲ Work under sterile conditions in a Laminar Flow!

- 1) Add 500 µl RNAlater reagent using RNase free filter tips with a 1000µl pipette to each 2ml RNase free screw-cap tube under sterile conditions!
- 2) Store RNAlater transport tubes at 4°C for up to 6 months (or between 8-25°C for long term storage up to 12 months).
- 3) Provide DAHWT with required amounts of RNAlater transport tubes upon request (40 tubes for phase I).

3

5. Stabilisation of swab samples in PANTA™/RNAlater for RNA/DNA extraction

Table 1. Samples, transport buffers and sample IDs per patient – Technical validation

| Samples type | Body site | Transport buffer | Sample ID |
|--------------|---------------|-------------------------|-----------|
| Nasal swab | right nostril | PANTA™ (500µl/sample) | NR.P.1 |
| Nasal swab | right nostril | RNAlater (500µl/sample) | NR.R.1 |
| Nasal swab | left nostril | PANTA™ (500µl/sample) | NL.P1 |
| Nasal swab | left nostril | RNAlater (500µl/sample) | NL.R.1 |

Table 2. Samples, transport buffers, and samples IDs per contact- Clinical validation

| Clinical validation | | | |
|---------------------|----------------|-------------------------|-----------|
| Samples type | Body site | Transport buffer | Sample ID |
| Nasal swab | left nostril | RNAlater (500µl/sample) | NL1.R.2 |
| Nasal swab | left nostril | RNAlater (500µl/sample) | NL2.R.2 |
| Buccal swab | oral mucosa | RNAlater (500µl/sample) | B1.R.2 |
| Buccal swab | oral mucosa | RNAlater (500µl/sample) | B2.R.2 |
| Slit skin smear | earlobe | RNAlater (500µl/sample) | SE.R.2 |
| Slit skin smear | leprosy lesion | RNAlater (500µl/sample) | SL.R.2 |

Table 3. Samples, transport buffers, and samples IDs per contact- Contact persons

| Application of Molecular Tools for the Identification of Silent Transmitters of Leprosy | | | |
|---|---------------|-------------------------|-----------|
| Samples type | Body site | Transport buffer | Sample ID |
| Nasal swab | right nostril | RNAlater (500µl/sample) | NR.R |
| Nasal swab | left nostril | RNAlater (500µl/sample) | NL.R |
| Oral swab | oral mucosa | RNAlater (500µl/sample) | B.R |

4

Abbildung 26. SOP2.b: Weiterverarbeitung der RNA/ DNA Proben (Seiten 3 und 4)

▲ The swab samples may be transported at ambient temperature for up to seven days! Apply the following conservation steps directly upon arrival of clinical samples at INH! Work in a biosafety cabinet class II!

In MDL technical validation part (RNA-assay, technical validation), besides samples in TLS and CLS (see P1.c) 4 samples per patient will arrive at INH in PANTA™ (NR.P.1 and NL.P.1) and RNAlater (NR.R.1 and NL.R.1) transport medium. Samples NR.P.1 and NR.R.1 (in PANTA™ and RNAlater, respectively) are supposed to be directly subjected to RNA/DNA extraction, samples NL.P.1 and NL.R.1 (parallel samples in PANTA™ and RNAlater, respectively) will be conserved and subsequently stored at -80°C (as backup samples) at INH without transcription into cDNA (these samples are only processed according to SOP P3 upon request of DITM/LMU)!

In MDL clinical validation part (RNA- assay, clinical validation), besides samples in CLS, 6 samples will arrive at INH in RNAlater transport medium (see table 2). Samples with sample ID NL2.R.2 and B2.R.2 will be stored as back-up samples at -80°C at INH.

In the part for the Identification of Silent Transmitters of Leprosy, besides samples in CLS (see SOP P1.b) if tested positive for leprosy (RLEP qPCR) 3 samples per patient will arrive at INH in RNAlater (NR.R, NL.R, B.R) transport medium. Samples B.R, NL.R and NR.R (in RNAlater, respectively) are supposed to be directly subjected to RNA extraction.

5.1. Stabilization of swab samples in PANTA™

- 1) Add 1 ml RNA Protect Bacteria reagent to each swab sample (NR.P.1 and NL.P.1) in 500 µl PANTA™ transport medium (2:1), vortex vigorously for 30 sec.
- 2) Incubate specimens for 5 min. at ambient temperature, vortex each sample every minute for 10 sec.
- 3) Inactivate samples at 95°C for 5 min., incubate on ice for 5 min.
- 4) Pellet material by centrifugation at 5000g at ambient temperature for 5 min., remove swab carefully and discard supernatant, keep pellets on ice and continue RNA/DNA extraction (only PANTA™ sample NR.P.1) with pellet (see SOP P3) or freeze pellets at -20°C for up to 3 month for RNA/DNA extraction at a later point in time. Freeze PANTA™ sample NL.P.1 at -80°C for backup up to 12 months at INH.

5

5.2. Stabilization of swab samples in RNAlater

- 1) Upon arrival at INH vortex samples in RNAlater vigorously for 30 sec.
- 2) Incubate samples for 12 h or overnight (max. 24h) at 2-8°C.

Patient samples with sample code NL2.R.2 and B2.R.2

Transfer samples to -80°C for long-term storage up to 12 months at INH (back-up samples) without transcription into cDNA (these samples are only processed according to SOP P3c V3 upon request of DITM/LMU)!

Patient samples with sample code NL1.R.2, B1.R.2, SE.R.2 and SL.R.2

- 2) Inactivate samples at 95°C for 5 min.
- 3) Centrifuge samples at 5000g at ambient temperature for 5 min. to pellet material, remove swab carefully and discard supernatant.
- 3) Keep pellets on ice and continue RNA/DNA extraction (only RNAlater sample NR.R.1) with pellet (see SOP P3c V3) or freeze pellets at -20°C for up to 1 month (or -80°C for 6 months) for subsequent RNA/DNA extraction at a later point in time.

6

Abbildung 27. SOP2.b: Weiterverarbeitung der RNA/ DNA Proben (Seiten 5 und 6)

| Anonymisierte Patienten ID | Probennummer | Transport-medium | RLEP qPCR ¹⁾ | TTC qPCR ²⁾ | 16S rRNA RT-qPCR ³⁾ | GAPDH qPCR ⁴⁾ |
|----------------------------|------------------|------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| T.A.MB.001 | T.A.MB.001.NR.T. | TLS | neg | neg | ND | pos |
| | T.A.MB.001.NL.T. | TLS | neg | neg | ND | pos |
| | T.A.MB.001.NR.C. | CLS | neg | neg | ND | pos |
| | T.A.MB.001.NL.C. | CLS | pos | neg | ND | ND |
| | T.A.MB.001.NR.R. | RNAlater | neg | neg | neg | neg |
| | T.A.MB.001.NL.R. | RNAlater | pos | neg | pos | ND |
| | T.A.MB.001.NR.P. | PANTA | pos | neg | neg | ND |
| | T.A.MB.001.NL.P. | PANTA | neg | neg | neg | ND |
| T.A.MB.002 | T.A.MB.002.NR.T. | TLS | pos | pos | ND | ND |
| | T.A.MB.002.NL.T. | TLS | pos | pos | ND | ND |
| | T.A.MB.002.NR.C. | CLS | pos | pos | ND | ND |
| | T.A.MB.002.NL.C. | CLS | pos | pos | ND | ND |
| | T.A.MB.002,NR.R. | RNAlater | pos | pos | pos | ND |
| | T.A.MB.002.NL.R. | RNAlater | pos | pos | pos | ND |
| | T.A.MB.002.NR.P. | PANTA | pos | pos | pos | ND |
| | T.A.MB.002.NL.P. | PANTA | neg | neg | pos | ND |
| T.A.MB.003 | T.A.MB.003.NR.T. | TLS | pos | neg | ND | ND |
| | T.A.MB.003.NL.T. | TLS | pos | neg | ND | ND |
| | T.A.MB.003,NR.C. | CLS | pos | neg | ND | ND |
| | T.A.MB.003.NL.C. | CLS | pos | neg | ND | ND |
| | T.A.MB.003,NR.R. | RNAlater | pos | neg | neg | pos |
| | T.A.MB.003.NL.R. | RNAlater | neg | neg | pos | ND |
| | T.A.MB.003.NR.P. | PANTA | pos | neg | neg | ND |
| | T.A.MB.003.NL.P. | PANTA | neg | neg | neg | ND |
| T.A.MB.004 | T.A.MB.004.NR.T. | TLS | neg | neg | ND | pos |
| | T.A.MB.004.NL.T. | TLS | neg | neg | ND | pos |
| | T.A.MB.004.NR.C. | CLS | pos | neg | ND | ND |
| | T.A.MB.004.NL.C. | CLS | pos | neg | ND | ND |
| | T.A.MB.004.NR.R. | RNAlater | neg | neg | neg | pos |
| | T.A.MB.004.NL.R. | RNAlater | pos | neg | pos | ND |
| | T.A.MB.004.NR.P. | PANTA | neg | neg | neg | ND |
| | T.A.MB.004.NL.P. | PANTA | neg | neg | neg | ND |
| T.A.MB.005 | T.A.MB.005.NR.T. | TLS | neg | neg | ND | pos |
| | T.T.MB.005.NL.T. | TLS | pos | neg | ND | ND |
| | T.T.MB.005.NR.C. | CLS | pos | neg | ND | ND |
| | T.T.MB.005.NL.C. | CLS | neg | neg | ND | pos |
| | T.T.MB.005.NR.R. | RNAlater | neg | neg | neg | pos |
| | T.T.MB.005.NL.R. | RNAlater | neg | neg | neg | pos |
| | T.T.MB.005.NR.P. | PANTA | neg | neg | neg | ND |
| | T.T.MB.005.NL.P. | PANTA | neg | neg | neg | ND |
| T.A.MB.006 | T.A.MB.006.NR.T. | TLS | neg | neg | ND | pos |
| | T.A.MB.006.NL.T. | TLS | neg | neg | ND | pos |
| | T.A.MB.006.NR.C. | CLS | pos | neg | ND | ND |
| | T.A.MB.006.NL.C. | CLS | pos | neg | ND | ND |
| | T.A.MB.006.NR.R. | RNAlater | neg | neg | neg | pos |
| | T.A.MB.006.NL.R. | RNAlater | neg | neg | neg | pos |
| | T.A.MB.006.NR.P. | PANTA | neg | neg | neg | ND |

| Anonymisierte Patienten ID | Probennummer | Transport-medium | RLEP qPCR ¹⁾ | TTC qPCR ²⁾ | 16S rRNA RT-qPCR ³⁾ | GAPDH qPCR ⁴⁾ |
|----------------------------|------------------|------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| | T.A.MB.006.NL.P. | PANTA | neg | neg | neg | ND |
| T.S.MB.007 | T.S.MB.007.NR.T. | TLS | neg | neg | ND | pos |
| | T.S.MB.007.NL.T. | TLS | neg | neg | ND | pos |
| | T.S.MB.007.NR.C. | CLS | pos | neg | ND | ND |
| | T.S.MB.007.NL.C. | CLS | neg | neg | ND | pos |
| | T.S.MB.007.NR.R. | RNAlater | neg | neg | neg | pos |
| | T.S.MB.007.NL.R. | RNAlater | neg | neg | neg | pos |
| | T.S.MB.007.NR.P. | PANTA | neg | neg | neg | ND |
| | T.S.MB.007.NL.P. | PANTA | neg | neg | neg | ND |
| T.T.MB.010 | T.T.MB.010.NR.T. | TLS | pos | pos | ND | ND |
| | T.T.MB.010.NL.T. | TLS | pos | pos | ND | ND |
| | T.T.MB.010.NR.C. | CLS | pos | pos | ND | ND |
| | T.T.MB.010.NL.C. | CLS | pos | pos | ND | ND |
| | T.T.MB.010.NR.R. | RNAlater | pos | neg | pos | ND |
| | T.T.MB.010.NL.R. | RNAlater | pos | pos | pos | ND |
| | T.T.MB.010.NR.P. | PANTA | pos | pos | pos | ND |
| | T.T.MB.010.NL.P. | PANTA | neg | neg | pos | ND |
| T.T.MB.011 | T.T.MB.011.NR.T. | TLS | pos | pos | ND | ND |
| | T.T.MB.011.NL.T. | TLS | pos | pos | ND | ND |
| | T.T.MB.011.NR.C. | CLS | pos | pos | ND | ND |
| | T.T.MB.011.NL.C. | CLS | pos | pos | ND | ND |
| | T.T.MB.011.NR.R. | RNAlater | pos | pos | pos | ND |
| | T.T.MB.011.NL.R. | RNAlater | pos | pos | pos | ND |
| | T.T.MB.011.NR.P. | PANTA | pos | pos | pos | ND |
| | T.T.MB.011.NL.P. | PANTA | neg | neg | pos | ND |
| T.T.MB.012 | T.T.MB.012.NR.T. | TLS | neg | neg | ND | pos |
| | T.T.MB.012.NL.T. | TLS | neg | neg | ND | pos |
| | T.T.MB.012.NR.C. | CLS | neg | neg | ND | pos |
| | T.T.MB.012.NL.C. | CLS | neg | neg | ND | pos |
| | T.T.MB.012.NR.R. | RNAlater | neg | neg | neg | pos |
| | T.T.MB.012.NL.R. | RNAlater | neg | neg | neg | pos |
| | T.T.MB.012.NR.P. | PANTA | neg | neg | neg | ND |
| | T.T.MB.012.NL.P. | PANTA | neg | neg | neg | ND |
| T.T.MB.013 | T.T.MB.013.NR.T. | TLS | pos | pos | ND | ND |
| | T.T.MB.013.NL.T. | TLS | pos | pos | ND | ND |
| | T.T.MB.013.NR.C. | CLS | pos | neg | ND | ND |
| | T.T.MB.013.NL.C. | CLS | pos | neg | ND | ND |
| | T.T.MB.013.NR.R. | RNAlater | pos | neg | neg | pos |
| | T.T.MB.013.NL.R. | RNAlater | pos | neg | pos | ND |
| | T.T.MB.013.NR.P. | PANTA | pos | neg | neg | ND |
| | T.T.MB.013.NL.P. | PANTA | pos | neg | neg | ND |
| T.T.MB.014 | T.T.MB.014.NR.T. | TLS | neg | neg | ND | pos |
| | T.T.MB.014.NL.T. | TLS | neg | neg | ND | neg |
| | T.T.MB.014.NR.C. | CLS | neg | neg | ND | pos |
| | T.T.MB.014.NL.C. | CLS | neg | neg | ND | pos |
| | T.T.MB.014.NR.R. | RNAlater | neg | neg | neg | pos |
| | T.T.MB.014.NL.R. | RNAlater | neg | neg | neg | pos |
| | T.T.MB.014.NR.P. | PANTA | neg | neg | neg | ND |

| Anonymisierte Patienten ID | Probennummer | Transport-medium | RLEP qPCR ¹⁾ | TTC qPCR ²⁾ | 16S rRNA RT-qPCR ³⁾ | GAPDH qPCR ⁴⁾ |
|----------------------------|------------------|------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| | T.T.MB.014.NL.P. | PANTA | neg | neg | neg | ND |
| T.T.MB.015 | T.T.MB.015.NR.T. | TLS | pos | pos | ND | ND |
| | T.T.MB.015.NL.T. | TLS | pos | pos | ND | ND |
| | T.T.MB.015.NR.C. | CLS | pos | pos | ND | ND |
| | T.T.MB.015.NL.C. | CLS | pos | pos | ND | ND |
| | T.T.MB.015.NR.R. | RNAlater | pos | neg | neg | pos |
| | T.T.MB.015.NL.R. | RNAlater | pos | neg | neg | pos |
| | T.T.MB.015.NR.P. | PANTA | pos | neg | neg | ND |
| | T.T.MB.015.NL.P. | PANTA | pos | neg | pos | ND |
| T.T.MB.016 | T.T.MB.016.NR.T. | TLS | neg | neg | ND | pos |
| | T.T.MB.016.NL.T. | TLS | neg | neg | ND | pos |
| | T.T.MB.016.NR.C. | CLS | neg | neg | ND | pos |
| | T.T.MB.016.NL.C. | CLS | neg | neg | ND | pos |
| | T.T.MB.016.NR.R. | RNAlater | neg | neg | neg | neg |
| | T.T.MB.016.NL.R. | RNAlater | neg | neg | neg | neg |
| | T.T.MB.016.NR.P. | PANTA | neg | neg | neg | ND |
| | T.T.MB.016.NL.P. | PANTA | neg | neg | neg | ND |
| T.T.MB.017 | T.T.MB.017.NR.T. | TLS | pos | pos | ND | ND |
| | T.T.MB.017.NL.T. | TLS | pos | pos | ND | ND |
| | T.T.MB.017.NR.C. | CLS | pos | pos | ND | ND |
| | T.T.MB.017.NL.C. | CLS | pos | pos | ND | ND |
| | T.T.MB.017.NR.R. | RNAlater | pos | neg | neg | neg |
| | T.T.MB.017.NL.R. | RNAlater | pos | neg | neg | neg |
| | T.T.MB.017.NR.P. | PANTA | pos | neg | neg | ND |
| | T.T.MB.017.NL.P. | PANTA | pos | neg | neg | ND |
| T.T.MB.018 | T.T.MB.018.NR.T. | TLS | pos | neg | ND | ND |
| | T.T.MB.018.NL.T. | TLS | pos | neg | ND | ND |
| | T.T.MB.018.NR.C. | CLS | pos | pos | ND | ND |
| | T.T.MB.018.NL.C. | CLS | pos | neg | ND | ND |
| | T.T.MB.018.NR.R. | RNAlater | neg | neg | neg | pos |
| | T.T.MB.018.NL.R. | RNAlater | neg | neg | neg | pos |
| | T.T.MB.018.NR.P. | PANTA | pos | neg | neg | ND |
| | T.T.MB.018.NL.P. | PANTA | neg | neg | neg | ND |
| T.T.MB.019 | T.T.MB.019.NR.T. | TLS | neg | neg | ND | pos |
| | T.T.MB.019.NL.T. | TLS | neg | neg | ND | pos |
| | T.T.MB.019.NR.C. | CLS | neg | neg | ND | pos |
| | T.T.MB.019.NL.C. | CLS | neg | neg | ND | pos |
| | T.T.MB.019.NR.R. | RNAlater | neg | neg | neg | pos |
| | T.T.MB.019.NL.R. | RNAlater | neg | neg | neg | pos |
| | T.T.MB.019.NR.P. | PANTA | neg | neg | neg | ND |
| | T.T.MB.019.NL.P. | PANTA | neg | neg | neg | ND |
| T.T.MB.020 | T.T.MB.020.NR.T. | TLS | neg | neg | ND | pos |
| | T.T.MB.020.NL.T. | TLS | neg | neg | ND | pos |
| | T.T.MB.020.NR.C. | CLS | neg | neg | ND | pos |
| | T.T.MB.020.NL.C. | CLS | neg | neg | ND | pos |
| | T.T.MB.020.NR.R. | RNAlater | neg | neg | neg | pos |
| | T.T.MB.020.NL.R. | RNAlater | neg | neg | neg | pos |
| | T.T.MB.020.NR.P. | PANTA | neg | neg | neg | ND |
| | | | | | | |

| Anonymisierte Patienten ID | Probennummer | Transport-medium | RLEP qPCR ¹⁾ | TTC qPCR ²⁾ | 16S rRNA RT-qPCR ³⁾ | GAPDH qPCR ⁴⁾ |
|----------------------------|------------------|------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| | T.T.MB.020.NL.P. | PANTA | neg | neg | neg | ND |
| T.T.MB.021 | T.T.MB.021.NR.T. | TLS | pos | pos | ND | ND |
| | T.T.MB.021.NL.T. | TLS | pos | pos | ND | ND |
| | T.T.MB.021.NR.C. | CLS | pos | pos | ND | ND |
| | T.T.MB.021.NL.C. | CLS | pos | neg | ND | ND |
| | T.T.MB.021.NR.R. | RNAlater | pos | neg | pos | ND |
| | T.T.MB.021.NL.R. | RNAlater | pos | pos | pos | ND |
| | T.T.MB.021.NR.P. | PANTA | pos | pos | pos | ND |
| | T.T.MB.021.NL.P. | PANTA | pos | pos | pos | ND |
| T.T.MB.022 | T.T.MB.022.NR.T. | TLS | pos | neg | ND | ND |
| | T.T.MB.022.NL.T. | TLS | pos | neg | ND | ND |
| | T.T.MB.022.NR.C. | CLS | pos | pos | ND | ND |
| | T.T.MB.022.NL.C. | CLS | pos | neg | ND | ND |
| | T.T.MB.022.NR.R. | RNAlater | pos | neg | neg | pos |
| | T.T.MB.022.NL.R. | RNAlater | pos | pos | pos | ND |
| | T.T.MB.022.NR.P. | PANTA | pos | pos | pos | ND |
| | T.T.MB.022.NL.P. | PANTA | pos | neg | neg | ND |

Tabelle 37. qPCR Ergebnisse der klinischen Validierung. ID = Kennung; pos = positives Ergebnis; neg = negatives Ergebnis; ND = nicht durchgeführt (cDNA Proben wurde zum RNA Nachweis mittels 16S rRNA RT-qPCR getestet). ¹⁾ Ergebnis der mittels RLEP qPCR getesteten DNA Proben. ²⁾ Ergebnis der mittels TTC qPCR getesteten DNA Proben. ³⁾ Ergebnis der mittels 16S rRNA RT-qPCR getesteten RNA Proben. ⁴⁾ Ergebnis der mittels GAPDH qPCR getesteten DNA Proben (Da PANTA wie unter 3.3.8.2. beschrieben weder humane Zellen noch mRNA konserviert, wurde die GAPDH qPCR für Proben aus diesem Medium nicht durchgeführt).

9. Danksagung

Frau Prof. Dr. Gisela Bretzel danke ich für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, die exzellente wissenschaftliche Betreuung und die Ermöglichung der praktischen Einsätze in Togo.

Ganz besonders möchte ich Herrn Dr. Marcus Beissner für die hervorragende Betreuung, stete Unterstützung und kritische Durchsicht der Arbeit danken.

Frau Magdalena Wagner danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit im Labor des Tropeninstitutes und ihre Unterstützung.

Ich danke Herrn Franz Xaver Wiedemann als Repräsentant der DAHWT für die freundliche Aufnahme während der praktischen Einsätze in Togo und die gute Zusammenarbeit.

Bei allen Mitarbeitern der Abteilung für Infektions-und Tropenmedizin bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme am Institut, im Besonderen bei Frau Kerstin Helfrich und Frau Carolin Mengele für die nette Einarbeitung im Labor.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, denen diese Arbeit gewidmet ist und die mich nach besten Kräften unterstützt haben!

10. Eidesstattliche Versicherung

Wöstemeier, Anna

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Etablierung und Validierung eines RNA basierten Viabilitätstests zum Nachweis von *Mycobacterium leprae* aus klinischen Isolaten von Lepra-Patienten aus Togo

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Köln, 02.05.2020

Anna Wöstemeier